

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA CARLA AGUSTINI

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS VÍNICAS E
IMPLANTAÇÃO DE UM BANCO DE DADOS SUPLEMENTAR
FUNDAMENTADO EM ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF**

CURITIBA

2014

BRUNA CARLA AGUSTINI

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS VÍNICAS E
IMPLANTAÇÃO DE UM BANCO DE DADOS SUPLEMENTAR
FUNDAMENTADO EM ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores:

Prof^a Dra Tania Maria Bordin Bonfim

Dr. Gildo Almeida da Silva

CURITIBA

2014

Agustini, Bruna Carla

Identificação molecular de leveduras vínicas e implantação de um banco de dados suplementar fundamentado em espectrometria de massa MALDI-TOF / Bruna Carla Agustini – Curitiba, 2014.

125 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Tania Maria Bordin Bonfim

Coorientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2014.

Inclui bibliografia

1. MALDI-TOF/EM. 2. PCR-RFLP. 3. ITS. 4. Sequenciamento. 5. Taxonomia.
I. Bonfim, Tania Maria Bordin. II. Silva, Gildo Almeida. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 663.2

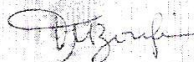
TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNA CARLA AGUSTINI


Título: "Identificação molecular de leveduras vínicas e implantação de um banco de dados baseado em espectrometria de massa MALDI-TOF"

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

Profª. Drª. Tania Maria Bordin Bonfim
Orientadora



Dr. Gildo Almeida da Silva
Embrapa Uva e Vinho



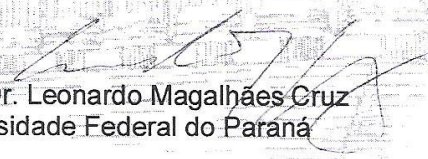
Dr. Luciano Paulino da Silva

Dr. Luciano Paulino da Silva
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Profª. Drª. Vania Aparecida Vicente
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Cynthia Maria Telles Fadel-Picheth
Universidade Federal do Paraná



Curitiba, 05 de dezembro de 2014.

A presente tese é resultado do acordo cooperativo, que entre si celebraram a Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) junto à unidade Uva e Vinho de Bento Gonçalves/RS. Estas duas instituições estabeleceram um projeto de pesquisa que foi contemplado com a bolsa de doutorado que subsidiou esta tese perante o Edital Conjunto CAPES/EMBRAPA nº 001/2011.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e a seus professores pelo aprendizado.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À Prof^a Dra Tania Maria Bordin Bonfim, por ser uma das minhas maiores inspirações no meio acadêmico. O desenvolvimento desta tese junto a Embrapa Uva e Vinho só foi possível porque ela sonhou e acreditou comigo nesta possibilidade. Detentora de um caráter ímpar e de uma imensa bondade, sempre me ensinou a equilibrar a vida pessoal e profissional. Obrigada pelo apoio, carinho e por todo o conhecimento repassado em mais esta etapa da minha trajetória profissional.

Ao Dr. Gildo Almeida da Silva, por me acolher em seu laboratório e me proporcionar os meios para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por todo o conhecimento transmitido e por permitir minha participação em outros projetos da Embrapa de forma a me proporcionar uma maior interação com o setor vitivinícola, demonstrando a aplicabilidade do nosso trabalho. Obrigada pela amizade, confiança e por impulsionar minha trajetória profissional.

Ao Dr. Luciano Paulino da Silva, pelo apoio irrestrito a este projeto e pela amizade. Pessoa nobre no seu modo de agir e de pensar. Tornou-se uma inspiração para minha vida profissional. Obrigada por me acolher em seu laboratório e compartilhar comigo momentos de valiosas discussões científicas.

Ao Dr. Carlos Bloch Júnior, por acreditar no nosso projeto e nos viabilizar o uso do equipamento de espectrometria de massa empregado nas análises de identificação.

À Dra. Rose Monnerat, por permitir o armazenamento das linhagens de leveduras no seu laboratório bem como por ter me proporcionado total liberdade de trabalhar com o cultivo das mesmas em Brasília, fornecendo todo o suporte necessário às análises de identificação.

Às amigas queridas do laboratório de Nanobiotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cinthia Caetano Bonatto e Ivy Garcez Reis por me acolherem de forma tão amistosa e por tornarem os meus dias de trabalho intenso em Brasília muito mais leve e divertidos.

Às colegas do laboratório de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial Carla Caixeta e Cristina Lima, pela amizade e por me proporcionarem o suporte necessário para os trabalhos de cultivo celular.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho, pelo harmonioso convívio e ajuda incondicional. Especial agradecimento às queridas

amigas Maria Antonieta Luvison Morini, Sheila Canossa e Fernanda Lucion pela amizade, pelo apoio nas análises e por tornarem os meus dias muito mais divertidos.

Aos colegas do laboratório de Virologia e Biologia Molecular Vegetal da Embrapa Uva e Vinho por proporcionarem todo o suporte para as análises de biologia molecular.

Aos colegas de laboratório de Enzimologia e Tecnologia de Fermentações, da UFPR, Flávia Deffert, Rossana Calegari e Fernanda Gaensly, por todo o apoio e conhecimento compartilhado.

Aos colegas de trabalho Gisele Perissutti, Odinéli Louzada, Letícia Flores e Fábio Rossi Cavalcanti por acreditarem no meu trabalho e pelo companheirismo no desenvolvimento das atividades diárias.

A todos os meus amigos de infância e faculdade, que embora não nomeados, sempre estiveram ao meu lado nesta caminhada.

À Henrique Ravanhol Frigeri, pelo apoio na realização desta tese e pela serenidade que nos fez superar a distância que nos separou neste período. Com você ao meu lado, tudo ficou mais fácil. Obrigada pelo carinho, paciência e por todo o companheirismo ao longo desta trajetória. Agradeço ainda, as imensas horas de assessoria em assuntos de biologia molecular, você foi um grande colaborador no desenvolvimento desta tese.

Ao meu irmão, Carlos Henrique Agustini, pelos seus ensinamentos e por ser um dos meus maiores incentivadores a prosseguir em mais esta etapa da minha caminhada acadêmica.

Ao meu pai, Carlos Agustini, por ser meu porto seguro. Seu sorriso a cada conquista minha foi sempre minha melhor recompensa. Obrigada por sempre ter um ensinamento para compartilhar e para me encorajar diante dos desafios.

À minha mãe, Olivete Joanes Peruzzo Agustini, pelo imenso amor. Obrigada por sempre estar ao meu lado e por nunca ter desistido de acreditar em mim e nas escolhas que fiz. Seu carinho e sua presença renovam as minhas energias e me dão forças a prosseguir.

À Deus, por ser minha sustentação e minha certeza de que tudo na vida tem um propósito maior e no final tudo se encaminha da melhor forma possível, basta ter fé.

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.

Theodore Roosevelt

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no oceano. Mas o oceano seria menor se lhe faltasse uma gota

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A criação de Coleções de Culturas para preservação dos recursos genéticos ganhou grande importância nas discussões realizadas durante a Eco-92 para o estabelecimento da Convenção sobre Diversidade Biológica. As Coleções de Culturas têm a função de isolar, caracterizar, identificar, conservar e disponibilizar microrganismos para o desenvolvimento de processos e obtenção de produtos de interesse econômico. A Embrapa reconhece a importância da conservação dos recursos microbianos para o desenvolvimento científico e tecnológico do país. Hoje, uma das Coleções desta instituição consiste na Coleção de Leveduras da Embrapa Uva e Vinho. Esta Coleção, até pouco tempo atrás, era um banco de manutenção de leveduras para elaboração de vinho, no qual a identidade de poucas era conhecida. A transição para se tornar uma Coleção oficial envolveu a etapa de identificação de todas as leveduras criopreservadas, tendo sido este o objetivo deste trabalho. As identificações microbianas podem ser conduzidas por técnicas convencionais (testes bioquímicos e morfológicos), técnicas de biologia molecular ou por método analítico como a espectrometria de massa. Este último apresenta alto rendimento, o que constitui uma vantagem para grandes demandas de identificações. Assim, as 871 linhagens de leveduras vínicas autóctones analisadas foram identificadas por espectrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS). Esta técnica exigiu a construção de uma biblioteca suplementar tendo em vista que os bancos de dados comerciais possuem, na sua maioria, espectros de referência voltados a microrganismos de importância clínica. Previamente a inserção das espécies no banco de dados suplementar, as espécies foram identificadas por técnicas de biologia molecular renomadas como PCR-RFLP e sequenciamento genético. Para a primeira foi amplificado a região ITS do DNA ribossomal com subsequente restrição enzimática usando as endonucleases *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *DdeI* e *MboII*. Para a segunda técnica utilizou-se o sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA. O banco de dados comercial usado foi capaz de identificar apenas 65,2% das leveduras analisadas. Ao empregar o Banco de Dados Suplementar todas as linhagens remanescentes foram também corretamente identificadas. Este banco de dados já tem sido utilizado por outros grupos de pesquisa associados a leveduras ambientais, demonstrando a aplicabilidade e a extensão da utilidade do mesmo. MALDI-TOF/ MS demonstrou ser uma técnica rápida, precisa e de baixo custo analítico para identificação taxonômica de leveduras ambientais com caráter industrial.

Palavras-chave: MALDI-TOF/EM; PCR-RFLP; ITS; Sequenciamento; Taxonomia

ABSTRACT

The creation of Culture Collections to preserve the genetic resources conquered great importance in the discussions carried out during Eco-92 in order to establish the Convention on Biological Diversity. The Culture Collections are intended to isolate, characterize, identify, conserve and distribute microorganisms. Embrapa recognizes the importance of maintaining microbial resources to give support to scientific and technical development of the country. Nowadays, one of Embrapa's Collections consists of Yeast Collection belonging to its subunit Embrapa Grape and Wine. This Collection, short while ago, was considered a local of yeast maintenance biased to vinification process, in which the identity of just a few was known. The transition to turn into an official Collection comprised an identification step of all cryopreserved yeasts, which became the principal aim of the present study. Microbial identification can be carried out by conventional techniques (biochemical and morphological tests), molecular biology techniques or by analytical methods such as mass spectrometry. The latter has a high yield, which consists in an advantage to large demands on identifications. Thus, 871 autochthonous wine yeast strains were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. This technique demanded the construction of a supplementary database, once the commercial databases available retain its standard spectrum biased towards microorganisms of clinical importance. Previously the step of spectrum insertion in the supplementary database, the species were identified by renowned molecular biology techniques as PCR-RFLP and sequencing. The first method amplified ITS region of ribosomal DNA with subsequently enzymatic restriction employing endonucleases *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *DdeI* e *MboI*. For sequencing, 26S rDNA D1/D2 region were amplified. The commercial database used were able to identify only 65.2% of the analysed yeast, while using also the Supplementary Database all the remaining strains were correctly identified. This Database has already been used by other research groups associated with environmental yeasts, demonstrating its applicability and usefulness. MALDI-TOF MS has demonstrated to be a fast, precise and a low analytical cost technique for taxonomic identification of environmental yeast strains with an industrial character.

Keywords: MALDI-TOF/MS; PCR-RFLP; ITS; Sequencing; Taxonomy

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - A UNIDADE DE REPETIÇÃO DO rDNA.....	31
FIGURA 2 - RESUMO ILUSTRADO DA TÉCNICA DE MALDI-TOF/MS PARA A IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA UTILIZANDO O MÉTODO DIRETO	36
FIGURA 3- AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO PARA OS PRIMERS ITS1 E ITS4.	49
FIGURA 4- OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES DA REAÇÃO DE PCR UTILIZANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4.....	50
FIGURA 5- PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO UTILIZANDO AS ENZIMAS <i>HinfI</i> (A), <i>HaeIII</i> (B) E <i>CfoI</i> (C).	51
FIGURA 6 - PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DAS ESPÉCIES <i>Candida akabanensis</i> , <i>Candida californica</i> , <i>Sporidiobolus ruineniae</i> E <i>Sporidiobolus pararoseus</i> UTILIZANDO A ENZIMA <i>HinfI</i> , <i>HaeIII</i> E <i>CfoI</i>	52
FIGURA 7 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DA ESPÉCIE <i>Zygoascus meyeriae</i> UTILIZANDO A ENZIMA <i>HinfI</i> , <i>HaeIII</i> E <i>CfoI</i>	52
FIGURA 8 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS DIFERENTES ESPÉCIES DE LEVEDURAS SUBMETIDAS AO GENBANK.....	60
FIGURA 9 – ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES DESENHADOS PARA A ESPÉCIE <i>Candida diversa</i> UTILIZANDO A FERRAMENTA BLASTN.....	65
FIGURA 10 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR EMPREGANDO OS INICIADORES 28candiv3 e 4.	66
FIGURA 11 - (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 21VVT97 ORIGINADOS DE CÉLULAS REATIVADAS E SEM REATIVAÇÃO E, (B) SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL	69
FIGURA 12 - (A) SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL E (B) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE <i>Pichia occidentalis</i> 22VVT97 ORIGINADOS DE CÉLULAS REATIVADAS E SEM REATIVAÇÃO.....	70
FIGURA 13 - MÉDIA DO NÚMERO DE PICOS PARA OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS FRENTE A DOIS MÉTODOS DE PREPARO DA AMOSTRA EMPREGANDO CÉLULAS CRESCIDAS EM MEIO YEPD.....	72
FIGURA 14 - RELAÇÃO SINAL/RUÍDO MÉDIA PARA OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS FRENTE A DOIS MÉTODOS DE PREPARO DA AMOSTRA EMPREGANDO CÉLULAS CRESCIDAS EM MEIO YEPD.....	73

FIGURA 15 - RESOLUÇÃO MÉDIA DOS 15 PICOS MAIS INTENSOS PARA OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS FRENTE A DOIS MÉTODOS DE PREPARO DA AMOSTRA EMPREGANDO CÉLULAS CRESCIDAS EM MEIO YEPD.....	74
FIGURA 16 – MÉDIA DO NÚMERO DE PICOS PRESENTES NOS ESPECTROS DE OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS CRESCIDAS EM DOIS MEIOS DE CULTURA DISTINTOS E SUBMETIDAS À EXTRAÇÃO CELULAR.....	74
FIGURA 17 – RELAÇÃO SINAL/RUÍDO MÉDIA PRESENTE NOS ESPECTROS DE OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS CRESCIDAS EM DOIS MEIOS DE CULTURA DISTINTOS E SUBMETIDAS À EXTRAÇÃO CELULAR.....	75
FIGURA 18 – RESOLUÇÃO MÉDIA APRESENTADA PELOS ESPECTROS DE OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS CRESCIDAS EM DOIS MEIOS DE CULTURA DISTINTOS E SUBMETIDAS À EXTRAÇÃO CELULAR.....	76
FIGURA 19- (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE <i>Kwoniella heveanensis</i> 43VSFCS10 E (B) SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL.....	77
FIGURA 20- (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 26B EM DIFERENTES TEMPOS DE CRESCIMENTO E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL	80
FIGURA 21 - (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 20VVT97 OBTIDOS COM DUAS MATRIZES DIFERENTES E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL	82
FIGURA 22 - VALORES DE LOG ESCORES PARA DIFERENTES LEVEDURAS DA ESPÉCIE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EMPREGANDO A MATRIZ CHCA E SA.....	82
FIGURA 23 - (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1VVT97 OBTIDOS COM DUAS MATRIZES DIFERENTES E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL	84
FIGURA 24- (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1VVT97 COM E SEM DILUIÇÃO DO EXTRATO CELULAR E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL	86
FIGURA 25 - (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE <i>Sporidiobolus ruineniae</i> 11VSFCS10 COM E SEM DILUIÇÃO DO EXTRATO CELULAR E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL	87
FIGURA 26 - (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE <i>Hanseniaspora uvarum</i> 15VVB97 E <i>Hanseniaspora opuntiae</i> 2VVT97 E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL.....	95
FIGURA 27 – COMPARAÇÃO DOS SINAIS ESPECTRAIS OBTIDOS PARA OS ESPECTROS DE REFERÊNCIA DAS ESPÉCIES <i>Candida akabanensis</i> E <i>Candida blattae</i>	96

FIGURA 28 – LINHAGENS DA ESPÉCIE <i>Candida akabanensis</i> PRESENTES NA COLEÇÃO DEMONSTRANDO A PRESENÇA DO PICO MARCADOR m/z 6927	97
FIGURA 29 – DIFERENCIAÇÃO EFETIVA DAS ESPÉCIES INSERIDAS NA BIBLIOTECA SUPLEMENTAR UTILIZANDO ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.	98
FIGURA 30 - DENDROGRAMA COM AS 21 ESPÉCIES DE LEVEDURAS PRESENTE NA COLEÇÃO	101
FIGURA 31 – REPRESENTAÇÃO EM FORMA DE SEPARAÇÃO EM GEL DOS ESPECTROS-PADRÃO DE TODAS AS ESPÉCIES CONTIDAS NA COLEÇÃO ANALISADA	102
FIGURA 32 – MICROSCOPIA DAS ESPÉCIES <i>Candida akabanensis</i> , <i>Candida apicola</i> , <i>Candida californica</i> E <i>Candida diversa</i>	104
FIGURA 33 – MICROSCOPIA DAS ESPÉCIES <i>Hanseniaspora uvarum</i> E <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	105
FIGURA 34 – MICROSCOPIA DAS ESPÉCIES <i>Issatchenkia hanoiensis</i> E <i>Issatchenkia terricola</i>	105
FIGURA 35 – MICROSCOPIA DA ESPÉCIE <i>Kwoniella heveanensis</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i> E <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	106
FIGURA 36 – MICROSCOPIA DAS CÉLULAS DE <i>Pichia galeiformis</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Pichia myanmarensis</i> E <i>Pichia occidentalis</i>	108
FIGURA 37 - MICROSCOPIA DAS CÉLULAS DE <i>Sporidiobolus ruineniae</i> E <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	108
FIGURA 38 – MICROSCOPIA DAS CÉLULAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Starmerella bacillaris</i> E <i>Zygoascus meyeriae</i>	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COLEÇÕES DE LEVEDURAS NO BRASIL REGISTRADAS NA WDCM.....	23
TABELA 2 – ESPÉCIES DE LEVEDURAS CLASSIFICADAS PELO SEU METABOLISMO E RELEVÂNCIA TECNOLÓGICA PARA A VINIFICAÇÃO.	26
TABELA 3 - DETALHAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO TAXÔNOMICA	37
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA A REAÇÃO DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS rDNA.....	40
TABELA 5 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA PCR PARA A REGIÃO DO rDNA COM OS OLIGONUCLEOTÍDEOS ITS1 E ITS4.	49
TABELA 6 - TAMANHO DOS AMPLICONS E DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DAS VINTE E DUAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS PRESENTES NA COLEÇÃO ANALISADA. ...	55
TABELA 7 – TAMANHO DO AMPLICON E DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Hanseniaspora</i> EMPREGANDO AS ENDONUCLEASES <i>MbolI</i> E <i>DdeI</i>	58
TABELA 8 – ESPÉCIES DE LEVEDURAS SEQUENCIADAS (REGIÃO D1/D2), SUAS RESPECTIVAS LINHAGENS E NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK.....	59
TABELA 9 - SEQUÊNCIA DA REGIÃO D1/D2 DA ESPÉCIE <i>Candida diversa</i> 1VVT99 E OS INICIADORES DESENHADOS A PARTIR DELA.....	64
TABELA 10 – COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA PRECISÃO INSTRUMENTAL E REPETIBILIDADE DAS ANÁLISES DO PERFIL MOLECULAR POR MALDI-TOF MS UTILIZANDO DUAS LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	89
TABELA 11 - VALORES DE LOG ESCORES PARA AS SEXTUPPLICATAS UTILIZADAS PARA O CÁLCULO DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO REFERENTE AO PARÂMETRO REPETIBILIDADE E PRECISÃO INSTRUMENTAL.....	90
TABELA 12 - RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR MALDI-TOF/MS USANDO PRIMEIRAMENTE O BANCO DE DADOS BIOTYPER E O BANCO DE DADOS SUPLEMENTAR.	92
TABELA 13 - RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> APÓS INCLUSÃO DO ESPECTRO DE REFERÊNCIA DA LINHAGEM VÍNICA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1VVT97 AO BANCO DE DADOS SUPLEMENTAR.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC: Coleção de Cultura Americana (do inglês, *American Type Culture Collection*)
- CDB: Convenção sobre Diversidade Biológica
- CGEN: Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
- CHCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (do inglês, *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*)
- CLEV: Coleção de Leveduras
- CMIA: Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial
- DGGE: eletroforese em gel de gradiente desnaturante (do inglês, *denaturing gradient gel electrophoresis*)
- DHB: ácido diidroxibenzóico ou ácido gentísico (do inglês, *2,5-dihydroxybenzoic acid* ou *gentisic acid*)
- ELNC: Extrato de Levedura Não-Comercial
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ERIC: sequências repetitivas enterobacterianas intergênicas de consenso (do inglês, *enterobacterial repetitive intergenic consensus*)
- ETS: espaçadores transcritos externos (do inglês, *External Transcribed Spacers*)
- IGS: espaçadores intergênicos (do inglês, *Intergenic Spacers*)
- ISS: sítios de clivagem dos introns (do inglês, *intron splice sites*)
- ITS – espaçadores internos transcritos (do inglês, *internal transcribed spacer*)
- LSU: subunidade maior do rDNA (do inglês, *large-subunit rDNA*)
- MALDI-TOF/MS - espectrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*).
- MSP: Perfil de Espectro de Massa (do inglês, *Mass Spectra Profile*)
- NTS: regiões não transcritas (do inglês, *Non-Transcribed Spacers*)
- PCA – análise de componentes principais (do inglês, *Principal Component Analysis*)
- PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)
- RAPD: análise de polimorfismo de DNA ao acaso (do inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA*)

rDNA: DNA ribossomal

REP: sequência palindrômica extragênica repetitiva (do inglês, *repetitive extragenic palindromic*)

RFLP – polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (do inglês, *restriction fragment length polymorphism*)

rRNA: RNA ribossomal

SA: ácido dimetoxi-4-hidroxicinâmico ou ácido sinapínico (do inglês, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid ou *sinapinic acid*)

SSU: subunidade menor do rDNA (do inglês, *small-subunit rDNA*)

TBE : solução tamponante Tris-borato-EDTA

TGGE: eletroforese em gel de gradiente de temperatura (do inglês, *temperature gradient gel electrophoresis*)

WDCM: Centro Mundial de Dados para os Microrganismos (do inglês, *World Data Centre for Microorganisms*)

WFCC: Federação Mundial para Coleções de Culturas (do inglês, *World Federation for Culture Collection*)

YEPD – meio de cultura com Extrato de levedura-Peptona-Dextrose (do inglês, Yeast extract-Peptide-Dextrose)

YM – extrato de levedura-extrato de malte (do inglês, *yeast extract-malt extract*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 COLEÇÃO DE CULTURAS MICROBIANAS	20
3.2 LEVEDURAS.....	23
3.2.1 Leveduras Vínicas.....	25
3.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE LEVEDURAS.....	27
3.3.1 Biologia Molecular.....	28
3.3.2 Espectrometria de Massa MALDI-TOF	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 COLEÇÃO DE LEVEDURAS	37
4.1.1 Meios de Cultura.....	38
4.1.2 Preservação das Leveduras.....	38
4.1.3 Crescimento das Leveduras.....	39
4.2 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR PCR-RFLP.....	40
4.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DO 26S rDNA.....	41
4.4 DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS	43
4.5 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR MALDI-TOF/MS	43
4.5.1 Preparo das Amostras	43
4.5.2 Aquisição dos Espectros e Análise dos Dados.....	44
4.5.3 Implantação do Banco de Dados Suplementar	45
4.5.4 Análises Estatísticas	46
4.6 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS LEVEDURAS DA COLEÇÃO.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48

5.1 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR BIOLOGIA MOLECULAR.....	48
5.1.1 Otimização da PCR com os Iniciadores ITS1 e ITS4	48
5.1.2 PCR-RFLP da Região ITS	50
5.1.3 Sequenciamento de DNA da Região D1/D2.....	58
5.1.4 Desenho de iniciadores específicos para a espécie <i>Candida diversa</i>	63
5.2 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF	67
5.2.1 Otimização da Metodologia quanto ao Crescimento Celular	67
5.2.2 Otimização da metodologia quanto ao meio de cultura e o método de preparo da amostra	71
5.2.3 Otimização da Metodologia quanto à Idade do Cultivo Celular	79
5.2.4 Otimização da Metodologia quanto à Escolha da Matriz e do Método de Deposição na Placa-Alvo.....	80
5.2.5 Otimização da Metodologia quanto à Concentração da Amostra	84
5.2.6 Análise da Precisão Instrumental e da Repetitividade das Análises.....	87
5.2.7 Identificação Taxonômica das Leveduras Empregando o Banco de Dados do Fabricante.....	91
5.2.8 Identificação Taxonômica das Leveduras empregando o Banco de Dados Suplementar	93
5.2.8.1 Avaliação da adição de um espectro padrão de uma linhagem vínica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> presente na Coleção ao Banco de Dados Suplementar .	98
5.2.9 Análise de Todas as Espécies Contempladas na Coleção.....	100
5.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS LEVEDURAS DA COLEÇÃO	103
5.3.1 Gênero <i>Candida</i>	103
5.3.2 Gênero <i>Hanseniaspora</i>	104
5.3.3 Gênero <i>Issatchenkia</i>	105
5.3.4 Gênero <i>Kwoniella</i>	106
5.4.5 Gênero <i>Metschnikowia</i>	106
5.4.6 Gênero <i>Meyerozyma</i>	107
5.4.7 Gênero <i>Pichia</i>	107
5.4.8 Gênero <i>Sporidiobolus</i>	108

5.4.8 Gênero <i>Saccharomyces</i>	109
5.4.9 Gênero <i>Starmerella</i>	109
5.4.10 Gênero <i>Zygoascus</i>	110
6 CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS	112

1 INTRODUÇÃO

A Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB, Rio de Janeiro, 1992) priorizou a conservação da variedade biológica como um dos seus principais objetivos. Sendo assim, a existência de Coleções de Culturas de Microrganismos tornou-se imprescindível. E mais do que conservar, estas Coleções possuem a função de distribuir estas culturas, assim como documentar e difundir todas as informações que contenham, relacionadas às espécies que abrange. Além disso, as Coleções de Culturas ganham maior prestígio à medida que fornecem um maior número de informações sobre as linhagens que disponibilizam, além de tornar pública uma maior diversidade de espécies. Sendo assim, a etapa de identificação taxonômica é a fase que precede a inserção de um microrganismo dentro de uma Coleção e, em seguida, a etapa que engloba os estudos de caracterização para desvendar o potencial biotecnológico de cada linhagem vem agregar valor a esta Coleção.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) reconhece que a conservação de recursos genéticos microbianos, assim como a pesquisa com esses organismos, constituem práticas indispensáveis ao desenvolvimento científico e tecnológico do país. Neste sentido, hoje uma das Coleções Institucionais desta empresa é a Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA). Nela se insere a Coleção de Leveduras (CLEV) da Embrapa Uva e Vinho, localizada no município de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. Anteriormente a etapa de criação e estruturação da CLEV, a mesma consistia apenas em um banco de armazenamento de leveduras, o que gerou a necessidade de identificação das linhagens nela contidas.

Há alguns anos, as únicas ferramentas para a identificação microbiana consistiam em métodos convencionais que empregavam a avaliação das características macro e microscópicas, coloração diferenciada e testes bioquímicos com os microrganismos. Avanços tecnológicos possibilitaram o uso de testes moleculares para aplicação rotineira na identificação, e mais, permitiram o emprego de equipamentos analíticos para determinar o perfil molecular dos microrganismos tornando-se uma ferramenta promissora no âmbito da taxonomia. A espectrometria de massa MALDI-TOF trouxe uma maior agilidade na obtenção dos resultados de identificação taxonômica contribuindo com as demandas por respostas rápidas nos

casos de contaminação alimentar, bioterrorismo e infecções causadas por microrganismos resistentes a antibióticos.

Em virtude do grande número de microrganismos que compõem a CLEV, este trabalho propôs o uso da espectrometria de massa MALDI-TOF como um método de identificação de leveduras vínicas utilizando o perfil molecular para diferenciação das espécies. Considerando que os bancos de dados comerciais são, na sua maioria, compostos por espectros-padrão de microrganismo de importância clínica, surge a necessidade da implantação de um Banco de Dados Suplementar para a identificação de leveduras ambientais de interesse industrial. Para tanto, metodologias de identificação baseadas em técnicas de biologia molecular já consagradas são exigidas para a identificação prévia e segura dos microrganismos, a exemplo do sequenciamento e da reação em cadeia da polimerase associada à análise do polimorfismo de fragmentos de restrição.

O Banco de Dados Suplementar que foi implantado ao longo deste estudo contribui com outros grupos de pesquisa associados a leveduras ambientais que se encontravam desprovidos de um banco de dados mais amplo voltado para a identificação deste grupo de microrganismos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

-Identificar, por métodos moleculares, espécies de leveduras vínicas autóctones presentes na Coleção da Embrapa Uva e Vinho e implantar um banco de dados por espectrometria de massa MALDI-TOF.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as leveduras presentes na Coleção de Leveduras da Embrapa Uva e Vinho por técnicas de biologia molecular, incluindo ITS-RFLP e sequenciamento genético.
- Analisar o banco de dados comercial baseado em espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação das espécies de leveduras pertencentes à Coleção da Embrapa Uva e Vinho.
- Otimizar fatores experimentais e biológicos que causam interferência na obtenção dos espectros de massa.
- Incluir espectros de massa de espécies de leveduras ausentes no banco de dados do fabricante de forma a implantar um Banco de Dados Suplementar.
- Avaliar a eficiência do Banco de Dados Suplementar na identificação de leveduras presentes na Coleção.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 COLEÇÃO DE CULTURAS MICROBIANAS

A Convenção sobre Diversidade Biológica é um tratado da Organização das Nações Unidas (ONU) e foi estabelecida durante ECO-92, realizada no Rio de Janeiro em 1992 e representa o principal fórum mundial para questões relacionadas ao tema. As discussões ambientais ali iniciadas tiveram continuidade no encontro do ano de 2012, quando da ocorrência da Rio+20. A Convenção tem por objetivos principais – a conservação da diversidade biológica, o uso sustentável da biodiversidade e a repartição justa e equitativa dos benefícios provenientes da utilização dos recursos genéticos. Para recursos genéticos entenda-se material genético de origem vegetal, animal ou microbiana que apresenta valor real ou potencial (BRASIL, 2000).

Assim, dá-se a importância da existência de Coleções de Culturas que são centros de conservação que têm a função de coletar organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, tornando-os disponíveis para usuários interessados. O isolamento, caracterização, identificação, seleção, conservação, disponibilização e uso de microrganismos são práticas imprescindíveis para o desenvolvimento de processos e obtenção de produtos de interesse econômico (ABREU; TUTUNJI, 2004). A preservação correta do microrganismo e a disponibilização do mesmo para a comunidade científica é fator primordial para qualquer Coleção. Dentro deste aspecto ressaltam-se os 20 anos que se passaram entre o depósito do microrganismo *Thermus aquaticus* na coleção ATCC e a descoberta deste como fonte da enzima Taq polimerase (BOUNDY-MILLS, 2012). Este fato demonstra os longos anos de trabalho diante das possibilidades de estudos que estão associados à caracterização das linhagens de leveduras presentes em uma Coleção para então, descobrir-se o seu potencial metabólico.

Programas de pesquisa como parte das atividades de uma Coleção de Cultura são recomendados pelo “Guia para o estabelecimento e operação das Coleções de Culturas de microrganismos” como uma maneira das Coleções estarem sempre atualizadas com as necessidades dos usuários (WFCC, 2010).

É importante ressaltar que toda Coleção de Cultura precisa de um sistema computadorizado adequado para manter em segurança todas as informações associadas aos microrganismos. Um backup das informações deve estar sempre atualizado e duplicado para assegurar a manutenção dos dados (SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013).

As Coleções precisam assegurar a correta identificação dos microrganismos, minimizar os riscos de mutações que ocorrem frequentemente com o emprego de transferências periódicas, além de assegurar a pureza e a viabilidade das culturas. E mais, precisam cumprir rígidas normas de qualidade para garantir a rastreabilidade de cada cultura bem como sua origem, número de repiques, local de armazenamento, entre outros.

Apesar de toda a função de conservação associada às Coleções, outra função essencial é a autenticação de linhagens depositadas por fontes externas de forma a fornecer linhagens validadas à comunidade científica (SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013).

Considerando que as coleções de microrganismos trabalham na sua essência com o acesso ao patrimônio genético, tendo a finalidade de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico, faz-se necessário obter uma autorização emitida pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) para a execução destas atividades. Este é um órgão do Ministério do Meio Ambiente, criado com o intuito de regulamentar a utilização dos recursos genéticos, fazendo com que toda essa biodiversidade deixasse de ser de acesso livre a qualquer pessoa.

A Embrapa reconhece que a conservação de recursos genéticos microbianos, assim como a pesquisa com esses organismos, constitui práticas indispensáveis ao desenvolvimento científico e tecnológico do setor agropecuário. O Laboratório de Microbiologia da unidade da Embrapa situada em Bento Gonçalves/RS, conhecida como Embrapa Uva e Vinho, possui a Coleção de Leveduras (CLEV) que está inserida na Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA).

O processo de estruturação da CLEV iniciou em 2010 juntamente com a criação da Rede de Recursos Genéticos Microbianos (Rede Microbiana). A Rede Microbiana promove a integração das coleções de microrganismos dispersas nas diferentes Unidades Descentralizadas da Empresa. Atualmente é composta por 20 Coleções contendo os seguintes grupos de microrganismos: multifuncionais,

agentes de biocontrole, fitopatogênicos, de interesse da agroindústria e da produção animal (EMBRAPA, 2010). Esta Rede tem como foco principal a prospecção da biodiversidade, a manutenção das coleções biológicas, e a organização da informação, com o intuito de garantir fornecimento de germoplasma microbiano para estudos de aplicação no agronegócio e setores produtivos relacionados. Uma das ações da Rede foi promover a disponibilidade das Coleções ao acesso público por meio de um sistema informatizado denominado AleloMicro (<http://alelomicro.cenargen.embrapa.br/InterMicro/index.xjs>) Este sistema abrange informações de microrganismos da Embrapa como um todo. Nele já estão inclusas algumas linhagens de leveduras da Coleção de Leveduras da Embrapa Uva e Vinho com informações a respeito de características fisiológicas e identificação taxonômica. Enfatiza-se que este sistema é de acesso livre a qualquer usuário interessado. A solicitação de amostras por usuários externos é feita para os curadores das Coleções que disponibilizam os agentes biológicos para intercâmbio.

A CLEV já se encontra devidamente registrada no banco de dados online *World Data Centre for Microorganisms* (WDCM) sob o número WDCM 1056. Esta Coleção ainda possui na pessoa do seu curador, a autorização do CGEN sob o número de acesso 02001.005557/2011-13 e número de protocolo 02001.007423/2011-37, concedendo permissão para toda a forma de pesquisa com as linhagens. Além disso, a CMIA da Embrapa Uva e Vinho encontra-se ainda devidamente credenciada junto ao CGEN como fiel depositária (Aviso de Credenciamento Nº 067/2013/SECEX/CGEN publicado no DOU Nº 194 de 05/10/2012, seção 3, p.156).

Segundo os dados da WDCM (http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/col_by_country/b/55/), o Brasil possui hoje 71 Coleções registradas, sendo que destas apenas 15 possuem leveduras nos seus bancos de armazenamento. A Coleção de Leveduras da Embrapa Uva e Vinho possui 2.000 linhagens de leveduras preservadas, o que a coloca como a quarta maior Coleção em quantidade de leveduras no Brasil (Tabela 1).

Algumas das Coleções elencadas trabalham exclusivamente com leveduras de importância clínica como é o caso do Centro especializado em micologia média (CEMM), Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (FIOCRUZ/CMRVS) e Micoteca do Instituto Adolfo Lutz (Micoteca – IAL). As demais

Coleções possuem leveduras de importância industrial de forma exclusiva ou conjunta com leveduras de importância clínica.

TABELA 1 – COLEÇÕES DE LEVEDURAS NO BRASIL REGISTRADAS NA WDCM

NOME DA COLEÇÃO	REGISTRO	QUANTIDADE DE MICRORGANISMOS
Coleção de Micro-organismos, DNA e Células da UFMG (CM-UFMG)	WDCM 1029	12.000 leveduras. Possui ainda fungos filamentosos e bactérias.
Central de Recursos Microbianos do Instituto de Biociências da UNESP (CRM-UNESP)	WDCM 1043	3.200 leveduras. Possui ainda fungos filamentosos e bactérias.
Universidade Federal de Pernambuco (URM)	WDCM 604	2.088 leveduras. Possui ainda fungos filamentosos.
Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial CMIA (CLEV)	WDCM 1056	2.000 leveduras. Possui ainda fungos filamentosos.
Centro especializado em micologia medica (CEMM)	WDCM 880	1.500 leveduras. Possui ainda fungos filamentosos.
Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Toselho (CCT-FAT)	WDCM 885	1.471 leveduras. Possui ainda bactérias e fungos filamentosos.
Micoteca do Instituto Adolfo Lutz (IALMIC)	WDCM 717	500 leveduras. Possui ainda fungos filamentosos.
Instituto Zimotécnico-ESALQ (ESAP)	WDCM 294	443 leveduras. Possui ainda fungos e bactérias.
Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (FIOCRUZ/CMRVS)	WDCM 575	162 leveduras. Possui ainda fungos filamentosos e bactérias.
Núcleo de Coleção de Micro-organismos (IAL)	WDCM 282	120 leveduras. Possui ainda fungos filamentosos, bactérias e protozoários.
Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA)	WDCM 114	75 leveduras. Possui ainda fungos e bactérias.
Coleção Microorganismos (IGESALQ)	WDCM 902	50 leveduras. Possui ainda fungos filamentosos e bactérias.
Micoteca do Instituto Adolfo Lutz (Micoteca – IAL)	WDCM 869	43 leveduras. Possui ainda fungos filamentosos.
Agrupamento de Biotecnologia, Culture Collection of Microorganisms (IPT)	WDCM 721	34 leveduras. Possui ainda fungos filamentosos e bactérias.
Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI)	WDCM 823	19 leveduras. Possui ainda bactérias, fungos filamentosos e protozoários.

3.2 LEVEDURAS

Leveduras são fungos unicelulares, com forma esférica, oval, alongada, elipsoidal ou ogival, que se reproduzem assexuadamente por brotamento (monopolar, bipolar ou multilateral) ou por fissão. Podem formar micélio verdadeiro

ou pseudo-micélio. São classificadas como ascomicetos e basidiomicetos, ambos denominados ainda de fungos perfeitos. Estes grupos podem apresentar reprodução sexuada pela formação de esporos. Os ascomicetos produzem esporos chamados de ascósporos. São assim denominados por serem produzidos dentro de sacos fechados, chamados de ascos. Os basidiomicetos produzem esporos chamados basidiósporos e são produzidos em estruturas chamadas de basídios. Estes esporos são células haploides que podem ser de dois tipos: “a” e “α” (*mating types*). A reprodução sexuada envolve células com fatores sexuais distintos para formar uma célula diploide vegetativa (a/α) (KREGER-VAN RIJ, 1984; MADIGAN *et al.*, 2012). Existe ainda uma terceira classificação que abrange os deuteromicetos ou leveduras imperfeitas (KREGER-VAN RIJ, 1984).

De acordo com o Dicionário de Fungos, na sua 10ª edição, até o ano de 2008 haviam sido descritas 100.000 espécies de fungos. Uma hipótese sobre a diversidade deste grupo de microrganismos estima que existam entre 1,5 milhão a 3 milhões de espécies de fungos distintas (HAWKSWORTH, 2012; SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013). No que concerne especificamente às leveduras, existem aproximadamente 1.500 espécies conhecidas. Estima-se que menos de 1% das espécies foram identificadas. Assim há um enorme potencial para novas identificações, não apenas no que concerne a novas espécies, mas também à utilidade para estas espécies (BOUNDY-MILLS, 2012).

Muito dessa incerteza a respeito da real diversidade dos fungos é reforçada em virtude da existência de sinônimos na nomenclatura dos mesmos. Considerando que fungos pleomórficos poderiam ser descritos de acordo com o sistema de dupla nomenclatura, no qual os nomes dados às diferentes morfologias (teleomorfo ou anamorfo) poderiam corresponder à mesma entidade (holomórfica)(SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013).

Com o emprego das técnicas moleculares de forma rotineira na taxonomia, a dupla nomenclatura não está mais em prática e, no momento, os micologistas estão tentando equalizar as nomenclaturas “*One Fungus = One Name*” (HAWKSWORTH *et al.*, 2011). Além desta modificação, foi também eliminada a necessidade da descrição de novas espécies em Latim, agora a língua inglesa será suficiente. Também passou a ser permitida a publicação de novas espécies em artigos de revistas *online* apenas, extinguindo a necessidade da publicação em revistas impressas (NORVELL, 2011).

3.2.1 Leveduras Vínicas

A superfície das bagas das uvas representa uma fonte para isolamento de leveduras, fungos filamentosos e bactérias. Nestas, a população de leveduras contempla diferentes gêneros, espécies e linhagens, que com suas atividades metabólicas individuais influenciam a qualidade sensorial e as características organolépticas do vinho (RASPOR *et al.*, 2006).

Entre os gêneros de leveduras presentes nas uvas se encontram *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora*, *Dekkera/Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* (FLEET, 2008). Estas e outras espécies de leveduras estão apresentadas na Tabela 2 de acordo com seu metabolismo e relevância biotecnológica.

As espécies de leveduras incluídas no grupo dos basidiomicetos são consideradas irrelevantes para o processo de vinificação em virtude da sua incapacidade de fermentar os açúcares do mosto (sumo de uvas frescas) e sobreviver durante o processo de vinificação. As espécies oxidativas, fracamente fermentativas ou fermentativas pertencem ao grupo dos ascomicetos e estão presentes nas etapas pré-fermentativas ou no início da fermentação. Leveduras fermentativas incluem aquelas responsáveis pela fermentação do vinho, especialmente pertencente à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Dentre as espécies fermentativas estão ainda aquelas com capacidade de deteriorar o vinho produzindo *off-flavours* ou turvação (BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012).

As espécies não-*Saccharomyces* iniciam a fermentação alcoólica espontânea do mosto de uva, mas a partir da metade do processo de vinificação, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são os microrganismos dominantes (FLEET, 2003). Estas espécies autóctones também apresentam crescimento mesmo em mosto de uvas que foram inoculadas com culturas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar do curto espaço de tempo no qual as mesmas permanecem no mosto, a atividade destes microrganismos durante as fermentações é suficiente para causar impacto com relação à composição química do vinho (FLEET, 2008). Muitas das espécies de leveduras não-*Saccharomyces*, especialmente as que apresentam metabolismo fracamente fermentativo, tem sido associadas à produção de

metabólitos que favorecem o aroma final dos vinhos (CIANI; COMITINI, 2011). O estudo de (ANDORRÀ *et al.*, 2012) demonstrou o aumento de compostos voláteis em vinhos com o uso de *Starmerella bacillaris* e *Hanseniaspora uvarum* em culturas mista com *Saccharomyces cerevisiae*.

TABELA 2 – ESPÉCIES DE LEVEDURAS CLASSIFICADAS PELO SEU METABOLISMO E RELEVÂNCIA TECNOLÓGICA PARA A VINIFICAÇÃO.

Grupo	Metabolismo	Gênero	Relevância Tecnológica
Basidiomicetos	Oxidativo	<i>Filobasidium</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Rhodotorula</i>	Ausente/Desconhecido
Ascomicetos	Oxidativo	<i>Aureobasidium</i>	Ausente/Desconhecido
	Oxidativo ou Fracamente Fermentativo	<i>Hanseniaspora</i> <i>Candida</i> <i>Metschnikowia</i> <i>Pichia</i> <i>Debaryomyces</i>	Aroma/Deterioração Aroma Aroma Aroma/Deterioração Aroma
	Fermentativo	<i>Torulaspora</i> <i>Zygossacharomyces</i> <i>Dekkera</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Schizosaccharomyces</i> <i>Saccharomycodes</i>	Deterioração Deterioração Deterioração Fermentação/Deterioração Deterioração Deterioração

Fonte: modificado de (CIANI; COMITINI, 2011; BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012)

Até o momento, o papel desta microbiota tem sido ignorado, com exceção dos fitopatógenos. Mas agora o conceito de *terroir* microbiano para as uvas viníferas tem sido valorizado (GILBERT; VAN DER LELIE; ZARRAONAINDIA, 2014). BOKULICH *et al.* (2013) demonstraram que a diversidade microbiana presente na uva está associada de forma não aleatória com os fatores regionais, climáticos e varietais, enfatizando assim a importância da flora microbiana sobre as características de qualidade do produto. Este estudo revela aplicações promissoras ao manejo dos parreirais e da fermentação vínica de forma a melhorar a qualidade da uva e do vinho de variedades específicas (BOKULICH *et al.*, 2013).

Introduzir a ecologia microbiana na agricultura apresenta uma ótima oportunidade para propiciar o entendimento real de observações que os viticultores e agricultores têm feito a milênios. Esta nova prática poderá ser utilizada para melhorar o *terroir* vinícola ou até mesmo reproduzir *terroirs* em locais considerados como não adequados para gerar um vinho com determinadas características

(GILBERT; VAN DER LELIE; ZARRAONAINDIA, 2014). Desta forma, uma caracterização mais abrangente da microbiota associada às vinhas é de suma importância para esta nova visão da agricultura. E, por consequência, o desenvolvimento de metodologias de identificação de microrganismos que sejam mais rápidas e seguras vem ao encontro desta demanda.

3.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE LEVEDURAS

A sistemática inclui os seguintes conceitos: (i) A taxonomia estuda a classificação e a identificação; (ii) A classificação agrupa os organismos dentro de uma categoria, de acordo com similaridades reais ou relações ancestrais presumidas, ou ambas; (iii) A identificação compara o desconhecido com indivíduos conhecidos e similares, e (iv) A nomenclatura, dá o nome aceito para aquele indivíduo (BARNETT; PAYNE; YARROW, 1990).

Uma espécie pode ser definida como uma coleção de linhagens compartilhando de características morfológicas, fisiológicas e genéticas comuns (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Há alguns anos, as únicas ferramentas para a identificação microbiana consistiam em características morfológicas, colorações diferenciais e testes bioquímicos (auxograma e zimograma). Estes testes são muitas vezes inconclusivos, em especial nos casos de leveduras que apresentam o efeito Custer (SILVA, 2005) e o efeito Kluyver (WEUSTHUIS *et al.*, 1994), os quais podem afetar o metabolismo do microrganismo, dificultando a identificação da espécie. Além disso, alguns inconvenientes podem surgir com aquelas espécies que se mostram fraco positivo, ou ainda, aquelas que apresentam resultado variável para alguns testes (ora sendo negativo, ora fracamente positivo) (SILVA, 2005). Outros estudos têm apontado as dificuldades do uso exclusivo dos métodos convencionais, visto que eles são muito dependentes de variáveis como meio de cultura e temperatura de crescimento. Além disso, os bancos de dados estão limitados às espécies mais comuns, e em termos gerais, são muito demorados na obtenção do resultado final (ÁLVAREZ-MARTÍN *et al.*, 2007; CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2010; BERNARDI; SILVA; VALENTE, 2011). O estudo de CENDEJAS-BUENO *et al.* (2010) demonstrou que a maioria das linhagens da espécie *Issatchenkia terricola* não puderam ser identificadas por métodos convencionais e quando estes métodos

chegaram a um resultado final, o mesmo forneceu uma identificação errônea (*Pichia membranifaciens*).

Atualmente, existe uma variedade de testes comerciais, manuais e automatizados, desenvolvidos de modo a agilizar a identificação microbiana. No caso da identificação de leveduras, pode-se citar o API 20C AUX e o API ID 32C, ambos produzidos pela BioMérieux; o Candifast produzido pela Oxoid e o Auxacolor da Sanofi Diagnostics Pasteur. No entanto, a maioria dos kits comerciais é destinada à identificação de leveduras de importância clínica e, portanto, os testes a serem adicionados aos painéis são escolhidos de acordo com o seu potencial discriminatório em relação a este grupo de leveduras. Assim, muitos testes essenciais estão ausentes no caso da identificação de leveduras presentes em alimentos e, conseqüentemente, não são identificadas (DEÁK, 1993; VELÁZQUEZ *et al.*, 2001).

Avanços tecnológicos possibilitaram o uso de testes moleculares para identificação de rotina, e mais, permitiram o uso de equipamentos analíticos para determinar o perfil molecular dos microrganismos o que torna tais testes, ferramentas promissoras no âmbito da taxonomia.

3.3.1 Biologia Molecular

As técnicas de biologia molecular têm se mostrado uma alternativa mais eficiente e rápida na identificação de leveduras. Elas podem ser divididas em duas categorias: (a) abordagens baseadas em PCR e (b) técnicas baseadas na hibridização de ácidos nucleicos. Nesta última categoria, um pequeno fragmento de DNA desenhado pode identificar, seletivamente, ácidos nucleicos a partir de uma mistura (MITCHELL; ZUCCARO, 2006). Um exemplo desta abordagem é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH, do inglês *fluorescent in situ hybridization*), a qual utiliza sondas de rRNA marcadas para possibilitar uma identificação rápida e precisa de microrganismos no seu ambiente natural (MOTER; GÖBEL, 2000; AMANN; FUCHS; BEHRENS, 2001). Esta técnica de hibridização consegue indicar o número e a distribuição espacial ou o ambiente celular dos microrganismos. Estudos sobre a ecologia do vinho também empregaram FISH para monitorar a população de leveduras durante o processo fermentativo (XUFRE *et al.*, 2006; WANG, CHUNXIAO; ESTEVE-ZARZOSO; MAS, 2014). Já as abordagens baseadas em

PCR empregam iniciadores para iniciar a replicação enzimática de uma sequência-alvo *in vitro*. Apesar das duas abordagens conseguirem estudar misturas de ácidos nucleicos de ambientes sem a necessidade de uma cultura prévia, as técnicas dependentes de PCR dominaram os estudos de diversidade molecular (MITCHELL; ZUCCARO, 2006).

O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) abriu novos caminhos para a identificação de microrganismos. A aplicação da PCR para a discriminação entre espécies de leveduras que emprega a amplificação de sequências alvo específicas ou aleatorizadas. A técnica de análise de polimorfismo de DNA genômico ao acaso (RAPD, do inglês *Random Amplified Polimorphic DNA*) utiliza pequenos iniciadores (5-15 pb) de sequências arbitrárias a baixas temperaturas de hibridização que se emparelham a regiões distribuídas de forma aleatória no genoma, permitindo a amplificação de fragmentos de DNA polimórficos (BALEIRAS COUTO *et al.*, 1994; XUFRE *et al.*, 2000; SALTANATPOUR *et al.*, 2011). Em contrapartida, algumas reações de amplificação utilizam iniciadores que emparelham em sequências repetitivas do genoma como é o caso dos sítios de clivagem dos introns (ISS, do inglês *intron splice sites*) (LOPES *et al.*, 1996; VIGENTINI; PICOZZI; FOSCHINO, 2011), da sequência palindrômica extragênica repetitiva (REP, do inglês *repetitive extragenic palindromic*) e das sequências repetitivas enterobacterianas intergênicas de consenso (ERIC *enterobacterial repetitive intergenic consensus*) (HIERRO *et al.*, 2004).

Outra metodologia utilizada de forma associada à PCR é a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE, do inglês *denaturing gradient gel electrophoresis*). Ela permite que fragmentos de DNA de igual tamanho possam ser separados em virtude de suas sequências divergentes. A migração do DNA é retardada quando as fitas de DNA se dissociam em uma concentração específica do agente desnaturante. O estudo de ANDORRÀ *et al.* (2008) demonstrou que esta técnica é ideal para detectar a diversidade de espécies de leveduras em uma mistura de microrganismos, desde que estejam em proporções relativas semelhantes. Isto porque a presença massiva de uma espécie em particular pode diminuir as chances de detectar outras espécies menos frequentes. Outra técnica relacionada à anteriormente descrita é a eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE, do inglês *temperature gradient gel electrophoresis*), na qual a

separação das moléculas de DNA se dá pelo gradiente de temperatura (FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 2011).

As metodologias apresentadas acima são compostas de uma única etapa, facilitando o processo de identificação de espécies e linhagens. No entanto, existe outra técnica muito utilizada para a identificação taxonômica chamada de PCR-RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), a qual consiste em duas etapas. Após a amplificação da região-alvo pela PCR, realiza-se a digestão do produto com endonucleases de restrição. Estas enzimas clivam o *amplicon* nas sequências palindrômicas específicas e os fragmentos restantes são separados por eletroforese em gel. O perfil de fragmentos revelado pela coloração do gel é então comparado com o perfil de espécies conhecidas para a identificação do microrganismo desconhecido (GUILLAMÓN *et al.*, 1998; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999).

Muitas das sequências alvo para confecção de iniciadores utilizam o DNA ribossomal (rDNA). Em leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*, o rDNA é composto por 150 a 200 cópias *in tandem*, localizadas no cromossomo XII. Cada uma destas cópias é formada por quatro genes de RNA ribossomal: a subunidade maior (LSU ou 26S rRNA), a subunidade menor (SSU ou 18S rRNA) e os genes 5S e 5.8S. Além disso, contém dois espaçadores transcritos internos (*Internal Transcribed Spacers*, ITS1 e ITS2) e dois externos (*External Transcribed Spacers*, ETS1 e ETS2), flanqueados por regiões não transcritas (*Non-transcribed Spacers*, NTS), as quais também são conhecidas por espaçadores intergênicos (IGS) (Figura 1) (VENEMA; TOLLERVEY, 1999; JAMES *et al.*, 2009).

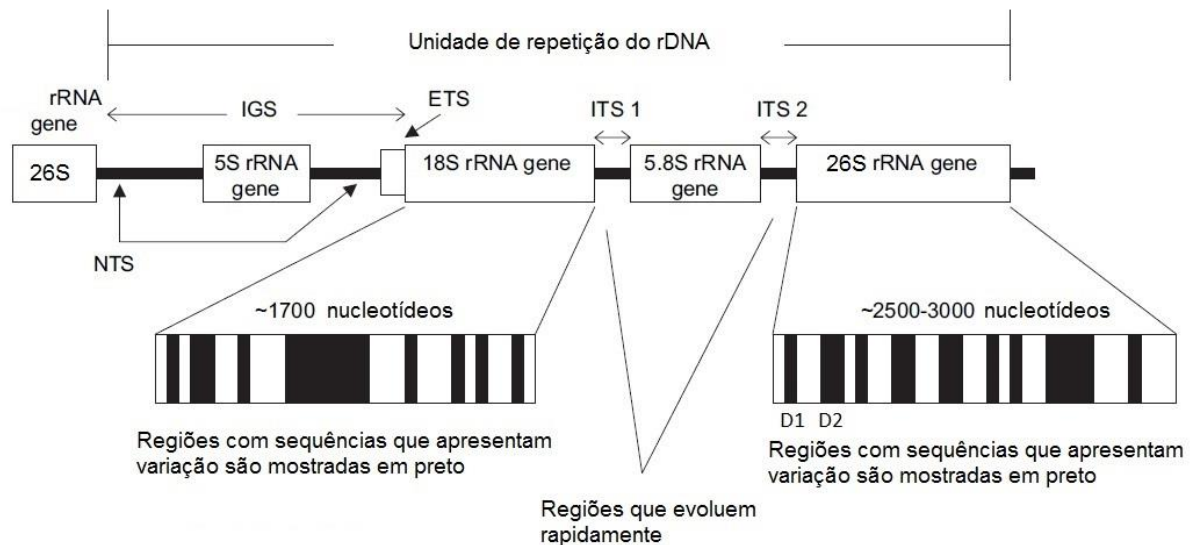


FIGURA 1 - A UNIDADE DE REPETIÇÃO DO rDNA.

Esta região compreende quatro genes principais (5S, 5.8S, 18S e 26S) intercalados entre os quais estão regiões espaçadoras (NTS – espaçador não transcrito; ETS – espaçador transcrito externo; ITS – espaçador transcrito interno).

Fonte: MITCHELL; ZUCCARO (2006)

O nível de conservação das sequências genéticas varia entre estas regiões gênicas e dentro dos genes. As regiões espaçadoras são as menos conservadas. Logo, evoluem em uma taxa maior que os genes. São esses espaçadores que são úteis na determinação da relação evolutiva em nível de espécie e abaixo deste. Os genes compreendem seções variáveis (denominadas “D” para o 26S e “V” para o 18S) e conservadas. Os oligonucleotídeos iniciadores são desenhados usando sequências das regiões conservadas de forma que os produtos de amplificação venham a abranger as regiões variáveis (MITCHELL; ZUCCARO, 2006).

O fato de cada unidade de repetição apresentar regiões altamente conservadas e outras variáveis tem permitido a análise de variação em diferentes níveis taxonômicos. A região do rDNA 18S é a mais conservada e, portanto é utilizada para a separação de organismos distantemente relacionados. A porção do 26S é mais variável, logo, mais apropriada para a comparação de diferentes gêneros e espécies. As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são indicadas para distinguir espécies relacionadas ou até mesmo linhagens (FUNGARO, 2000). Os espaçadores internos ITS1 e ITS2 têm sido utilizados para a diferenciação de espécies em virtude da sua alta variabilidade utilizando a técnica de PCR-RFLP

(GUILLAMÓN *et al.*, 1998; HIERRO *et al.*, 2004; ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2006; RASPOR; ZUPAN; CADEZ, 2007).

Além disso, a região ITS bem como o domínio D1/D2 presente no 26S rDNA têm sido utilizados em reações de sequenciamento para auxiliar na diferenciação microbiana (KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, 2003; ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2006; BAUTISTA-GALLEGO *et al.*, 2011). As sequências D1/D2 e ITS geralmente apresentam resolução similar na diferenciação de espécies de leveduras, entretanto variações podem ocorrer dependendo da espécie (KURTZMAN, C. P., 2014). A região ITS foi recentemente escolhida como o “código de barras (*barcode*)” para fungos (SCHOCH *et al.*, 2012). No entanto, muito antes do conceito de “*barcode*” ter sido introduzido, a região D1/D2 já tinha sido escolhida para diferenciar leveduras (KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, 1998; SCORZETTI *et al.*, 2002; SCHOCH *et al.*, 2012). Atualmente, ambos os bancos de dados referentes à região D1/D2 e ITS se apresentam como potentes ferramentas para a identificação segura de espécies de leveduras (KURTZMAN, C. P., 2014). O estudo de HUGHES; PETERSEN; LICKY (2009) postula que, para a identificação bem sucedida de uma espécie, é necessário que a análise no BLAST resulte em uma cobertura maior que 80% e em uma similaridade igual ou superior a 98% para alguma entrada no GenBank.

3.3.2 Espectrometria de Massa MALDI-TOF

Os princípios da espectrometria de massa foram estabelecidos há mais de um século, e as primeiras tentativas do uso desta técnica na identificação de microrganismos foram realizadas em 1975 por Anhalt e Fenselau utilizando o impacto eletrônico como fonte de ionização (FENSELAU; DEMIREV, 2001). No entanto, estes experimentos se mostraram irreprodutíveis devido a variabilidades causadas pelas condições de crescimento e pelo meio de cultura utilizado para o desenvolvimento microbiano. Na década de 80, os pesquisadores Karas e Hillenkamp promoveram o desenvolvimento de uma ionização branda caracterizada pela ionização/dessorção a laser assistida por matriz associada em analisador por tempo de voo (MALDI-TOF/MS), provocando novo interesse na aplicação da espectrometria de massa na identificação microbiana (SANDRIN; GOLDSTEIN; SCHUMAKER, 2013). Em 1994, CAIN *et al.* (1994) conseguiram diferenciar bactérias pelo perfil proteico das células lisadas com o uso do MALDI-TOF MS. Esta

nova ferramenta possibilitou a análise de biomarcadores com massas moleculares maiores, incluindo proteínas ribossomais (FENSELAU; DEMIREV, 2001; WIESER *et al.*, 2012). As moléculas detectadas são, geralmente, proteínas originárias do citosol, compartilhando características como alta abundância, forte caráter básico e média hidrofiliidade (RYZHOV; FENSELAU, 2001). Entre as proteínas, tentativamente identificadas nos espectros de massa estão as ribossomais, mitocondriais, de membrana, de ligação ao DNA e proteínas de choque frio (CLAYDON *et al.*, 1996; ARNOLD; REILLY, 1999; AMIRI-ELIASI; FENSELAU, 2001; RYZHOV; FENSELAU, 2001). No entanto, metabólitos secundários, lipopeptídeos, ácidos graxos e outros lipídeos de membrana também já foram relatados nos espectros de massa (CLAYDON *et al.*, 1996; ERHARD; VON DOHREN; JUNGBLUT, 1997; HATHOUT *et al.*, 2000). Assim, a identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF está baseada na análise de características fenotípicas, as quais variam de acordo com o meio de cultura, as condições de crescimento e de análise, entretanto estas variações são, em geral, mínimas e não comprometem o processo de identificação (BERNARDO *et al.*, 2002; WALKER *et al.*, 2002; VALENTINE *et al.*, 2005; VARGHA *et al.*, 2006). Porém, no que concerne à reprodutibilidade da técnica, o controle das condições experimentais é fundamental (SAENZ *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2003).

Esta metodologia se consagrou como um método rápido e de alto rendimento para identificação microbiana. Primeiramente, ela foi aplicada à análise taxonômica de bactérias (CLAYDON *et al.*, 1996; HOLLAND *et al.*, 1996; DEMIREV *et al.*, 1999) e posteriormente também utilizada de forma eficaz na identificação de leveduras e fungos filamentosos (MARKLEIN *et al.*, 2009; HENDRICKX *et al.*, 2011; PAN *et al.*, 2011). O MALDI-TOF/MS possui a capacidade de avaliar misturas complexas de proteínas e peptídeos, revelando um padrão de picos característicos para cada espécie, gerando o que se pode chamar de “impressão digital” microbiana (DE BRUYNE *et al.*, 2011).

O MALDI-TOF/MS é muito sensível, sendo capaz de detectar sinais originados de uma amostra contendo uma concentração menor que 10^4 células intactas (DEMIREV; FENSELAU, 2008). Além disso, o custo de análise (excluindo o valor do equipamento) desta técnica pode ser um quarto do valor das metodologias convencionais (SENG *et al.*, 2009).

Há dois métodos para o preparo da amostra, o método direto e o da extração celular. No método direto (Figura 2), uma pequena porção da colônia isolada de um microrganismo é espalhada diretamente sobre a placa-alvo e a matriz orgânica (substância que facilita a ionização da amostra) é adicionada sobre ela. Esta técnica é com maior frequência utilizada para a identificação de espécies bacterianas (GAIA; CASATI; TONOLLA, 2011; VELOO *et al.*, 2011). Por vezes, melhores resultados de identificação bacteriana são relatados com o uso da extração proteica (ALATOOM *et al.*, 2011). Da mesma forma, para identificações de leveduras, o uso de um método de extração celular ou uma metodologia que melhore a qualidade do espectro de massa no que se refere ao aumento do número de íons característicos com uma maior razão sinal/ruído é requerido para garantir o sucesso da análise (QIAN *et al.*, 2008; MARKLEIN *et al.*, 2009).

A qualidade do espectro adquirido é altamente dependente da escolha da matriz, da composição da mistura de solventes empregada para solubilizar a matriz, do procedimento de preparo da amostra e do método de aplicação da amostra no suporte que será utilizado para a análise no equipamento (SEDO; SEDLACEK; ZDRAHAL, 2011). Um grande número de matrizes diferentes está disponível comercialmente. Todas requerem algumas propriedades físicas e químicas para seu amplo uso: (a) uma eficiente absorbância no comprimento de onda de excitação do laser, (b) uma ionização eficiente, (c) uma estabilidade razoável para não interferir com o espectro de massa da amostra (CARBONNELLE *et al.*, 2011). Ao absorver o laser de nitrogênio (luz UV, $\lambda=337$ nm), a matriz o converte em energia térmica, ao mesmo tempo em que outra parcela da matriz é rapidamente aquecida sendo vaporizada com a amostra. A escolha da matriz depende da natureza da amostra a ser estudada. As matrizes mais comumente utilizadas são o ácido diidroxibenzóico (DHB), também conhecido como ácido gentísico; o ácido dimetoxi-4-hidroxicinâmico, também conhecido como ácido sinapínico (SA); e o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA). O DHB permite o estudo de oligossacarídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas. Geralmente o DHB é mais eficiente para componentes de baixa massa molecular, enquanto o SA e o CHCA permitem, especialmente, o estudo de peptídeos e proteínas (CARBONNELLE *et al.*, 2011). O uso do ácido ferúlico, como matriz, possibilita a análise de proteínas com alta massa molecular (maiores que 70 kDa) (LAY, 2001).

De forma geral, a volatilidade do solvente que solubiliza a matriz é, com frequência, modificada para promover, por exemplo, a ionização de biomoléculas de tamanhos maiores que exigem uma cristalização lenta. Ou ainda, promover o aumento da evaporação do solvente de modo a formar pequenos cristais homogêneos e assim, aumentar a reprodutibilidade a cada disparo do laser (SEDO; SEDLACEK; ZDRAHAL, 2011). A adição de um ácido na composição dos solventes é uma etapa lógica quando se deseja detectar espécies protonadas (íons positivos). Além do aumento na eficiência da ionização, o impacto positivo do aumento da concentração de ácidos na qualidade do perfil gerado pelo MALDI-TOF/MS pode ser explicado por meio do aumento da solubilidade proteica e melhor eficiência na extração destes componentes (SEDO; SEDLACEK; ZDRAHAL, 2011).

O programa Biotyper (Bruker Daltonics, Alemanha) contém um banco de dados utilizado para identificação de microrganismos, uma vez que contempla espectros de massa, obtidos por MALDI-TOF, oriundos de bactérias, fungos e leveduras. Os resultados das análises neste banco são liberados na forma de log escores que variam de 0 a 3,0, valores gerados pela comparação entre a lista de sinais de um isolado desconhecido com um espectro de referência, levando em consideração informações referentes a relação massa/carga (m/z), a intensidade relativa do sinal e as frequências dos picos presentes (BEL *et al.*, 2011).

Com o intuito de prevenir identificações incorretas, o critério para se aceitar uma identificação é rigoroso. Assim, um resultado é considerado consistente, no que concerne à espécie do microrganismo, quando apresentar um valor de log escore $\geq 2,0$. Quando o log escore ficar entre 1,7 e 2,0 apenas o gênero é confirmado. E, finalmente, quando o resultado for $\leq 1,7$ significa insucesso na identificação (MARKLEIN *et al.*, 2009).

Em um primeiro momento esta ferramenta de identificação taxonômica estava restrita aos laboratórios de pesquisa. No entanto com o desenvolvimento de equipamentos de fácil utilização, a rotina de identificação de patógenos existente em laboratórios de microbiologia clínica começaram a mudar na direção de uma maior agilidade na obtenção dos resultados (BIZZINI; GREUB, 2010). O advento de uma técnica que demanda um menor tempo de espera para a precisa identificação microbiana vem ao encontro das demandas por uma resposta rápida quanto à identidade dos agentes de contaminação alimentar, de bioterrorismo e de microrganismos de importância clínica resistentes a antibióticos (MURRAY, 2010).

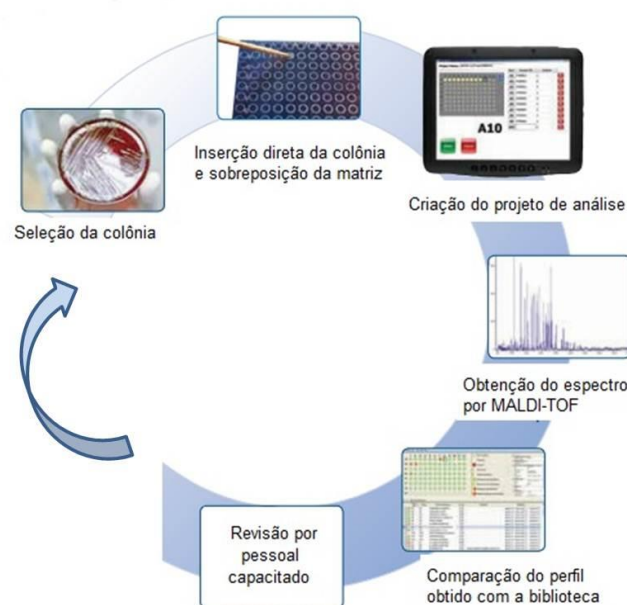


FIGURA 2 - RESUMO ILUSTRADO DA TÉCNICA DE MALDI-TOF/MS PARA A IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA UTILIZANDO O MÉTODO DIRETO

FONTE: Bruker Daltonics Corporation

Além disso, a aplicabilidade desta ferramenta abrange os campos da biotecnologia, da microbiologia ambiental e industrial (CHALUPOVA *et al.*, 2012; MOOTHOO-PADAYACHIE *et al.*, 2013). No entanto, para estes microrganismos em específico, geralmente se faz necessária uma etapa adicional que consiste na implantação de uma biblioteca com a inserção dos espectros-padrão destas espécies. Isto porque, grande parte dos microrganismos presentes nos bancos de dados comerciais para MALDI-TOF MS são de importância clínica e, portanto, não abrangem os microrganismos ambientais. É preciso identificar estes microrganismos empregando técnicas capazes de discriminá-los com segurança, como as técnicas de biologia molecular que empregam PCR e sequenciamento, previamente a criação dos espectros-padrão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLEÇÃO DE LEVEDURAS

A Coleção de Leveduras (CLEV) da Embrapa Uva e Vinho, apresenta atualmente 2000 linhagens de leveduras depositadas. Destas, 871 linhagens foram objeto de estudo deste trabalho. As linhagens encontram-se subdivididas em séries que indicam a localização do vinhedo e a variedade da uva que serviu como fonte de isolamento daquelas leveduras (Tabela 3).

TABELA 3 - DETALHAMENTO DAS LINHAGENS UTILIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO TAXÔNOMICA

SÉRIE	NÚMERO ASSOCIADO ÀS LINHAGENS IDENTIFICADAS	N
VVT97	1; 2; 4-7; 12; 14; 17; 19-25; 27-40	30
VVT96	2; 3; 60; 89; 95; 98-100; 103	9
B	1-17; 19-20; 22; 24-29; 31; 32; 34-52; 54-59; 61-77; 79-84; 88; 89; 91	79
VVT99	1; 3-5; 8; 9; 12-14; 16-17; 21; 24-26; 29-33; 35-36; 38; 41; 42; 44-48; 50; 56; 57; 59; 61; 62; 64; 68; 70; 71; 74-75; 78-80; 83; 84; 86-90; 92; 94; 95; 97-100; 103-106	63
VVT02	4-9; 11; 12; 14; 16-18; 20-22; 24; 26-30; 32; 33; 35-45; 47-51; 54-65; 67; 69-85	69
VVB97	1-3; 5-8; 11; 12; 14; 15; 17; 19; 20-26; 29-32; 34-37; 40	29
CNPUV 02	1, 2, 4, 7-10, 13-16; 18; 20; 21; 25; 26; 28-38; 40-45; 47-51; 53; 58-60; 63; 64; 68; 70; 71; 74-76; 79-83	55
T	1-7; 9-27; 29-84; 86-110; 112-138; 140-177; 180-188; 191-196; 198; 199; 201-214; 216-220; 222; 223; 225-231; 234-239; 241-247; 249-264; 266; 268-273; 275-300; 302; 303; 306-318; 320-323; 325-333; 335; 337-353; 355-357; 359-363; 366-369; 371-379; 381-400; 402; 405; 408-414; 416-419; 421-423; 425; 435; 439; 442; 444; 449; 450; 466; 468; 469; 472; 476; 486; 487; 492; 495; 499; 500; 506; 510; 511; 520; 521; 529-532; 536; 538; 539; 542-543; 551; 553	416
Tuiuti06	1; 2; 4-13	12
MB	24	1
VSFSB	2; 7; 9; 17; 20-24; 26; 28; 30; 32; 38; 39; 42; 43; 46; 47	19
VSFCB	2; 6; 8; 10; 11; 18; 19; 25; 28; 29; 31; 36; 39-41; 43; 48	17
VSFCS	1; 2; 4-8; 10; 11; 13; 15-17; 20; 22; 24; 32; 38; 41; 42; 44; 45; 48	23
VSFS	10; 13; 18; 23; 25; 30; 33; 34; 36; 37; 39	11
VSFI	1; 3-5; 7; 10; 11; 13-15; 24-26; 31; 35; 36; 40-43; 46; 48-50	24
TA	1; 107; 123; 195; 201; 220; 244; 246; 277; 326; 360; 425	12
F2	1	1
XYL12	1	1

N = número de linhagens contidas em cada série

Estas leveduras foram todas isoladas da superfície de bagas de uva da espécie *Vitis vinifera* L. cultivadas na sua grande maioria na Serra Gaúcha/RS e, em menor parte no Vale do São Francisco/PE.

4.1.1 Meios de Cultura

Foram utilizados para a realização dos experimentos que compõem este trabalho os seguintes meios de cultura:

(A) Meio YEPD, composto por 10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ peptona, 20 g.L⁻¹ glucose; quando empregado na forma sólida foi adicionado de 20 g.L⁻¹ ágar;

(B) Meio YM, composto de 5 g.L⁻¹ peptona, 3 g.L⁻¹ extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ extrato de malte, 20 g.L⁻¹ ágar;

(C) Meio Mosto-Ágar, composto por 10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 250 mL de mosto de uvas, 20 g.L⁻¹ de ágar (DA SILVA, 1996);

(D) Meio Criopreservante Duplo, composto por 24,65 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 10 mL.L⁻¹ tampão fosfato pH 4,0; 100 g.L⁻¹ sacarose; 650 mL.L⁻¹ glicerol.

(E) Meio G7, composto 100 g.L⁻¹ sacarose; 114 mL.L⁻¹ extrato de levedura não comercial (ELNC).

O ELNC é preparado a partir de leveduras remanescentes do processo de produção cerveja na proporção de 1:4 em água destilada (DA SILVA, 2002). Esta suspensão é fervida durante 5 minutos para extrusão do conteúdo celular e, em seguida, é deixada em geladeira para decantação dos restos celulares. O sobrenadante remanescente é utilizado como o extrato de levedura não-comercial.

4.1.2 Preservação das Leveduras

As leveduras foram preservadas pela técnica de congelamento e se encontram armazenadas em tubos de polipropileno (próprios para criopreservação) a -80°C. Para a criopreservação, 500 µL do meio criopreservante foram adicionados a 500 µL do meio G7 contendo o microrganismo crescido por 24-48 horas a 25°C.

4.1.3 Crescimento das Leveduras

Para as análises de MALDI-TOF MS, foi avaliada a influência de diferentes formas de crescimento das leveduras sobre o espectro coletado:

(A) *Crescimento em ambiente compartilhado*: as células criopreservadas foram descongeladas à temperatura ambiente e uma alíquota de 3 μ L foi depositada em placas de Petri contendo meio de cultura YEPD. Estas alíquotas foram depositadas na forma pontual e espaçadas de tal forma que cada placa de Petri recebesse 32 linhagens distintas para a melhor utilizar o espaço disponível na placa;

(B) *Crescimento individual em tubo*: as células criopreservadas foram descongeladas à temperatura ambiente e uma alíquota de 10 μ L foi depositada, de forma individual, em tubos contendo ágar inclinado YEPD;

(C) *Crescimento em meio líquido e sólido*: as células criopreservadas foram primeiramente crescidas em meio líquido YEPD para posterior transferência para tubos contendo meio sólido YEPD. Para tal, 15 μ L das células criopreservadas foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio YEPD líquido. Estes frascos foram mantidos a 25 °C em agitador-incubador (New Brunswick, EUA) a 100 rpm durante 24-48 horas. Em seguida, as células foram transferidas para tubos contendo meio YEPD sólido.

Depois de inoculadas as placas e os tubos foram levados à estufa (Lab-Line Instruments, EUA) a temperatura de 25°C por 48 horas para possibilitar o crescimento celular.

Para avaliar a influência do meio de cultura no espectro de massa coletado foi utilizado ainda o meio YM. A idade do cultivo celular também foi avaliada quanto a sua influência ao perfil espectral coletado. Culturas de 24 a 144 horas de crescimento foram utilizadas nesta avaliação.

Para os trabalhos de biologia molecular, uma alíquota de 10 μ L da suspensão de cada levedura criopreservada foi crescida em tubo, contendo meio mosto-ágar. Os tubos foram levados à estufa (Lab-Line Instruments, EUA) com temperatura de 25°C por 24-48 horas para possibilitar o crescimento celular.

4.2 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR PCR-RFLP

A metodologia empregada para extração do material genômico foi descrita por Silva *et al.* (2012). Nesta, o material genômico das leveduras sofre extrusão pelo congelamento seguido do descongelamento de uma suspensão de células.

As suspensões foram preparadas em uma concentração aproximada de 10^6 células.mL⁻¹ com o uso de água ultra-pura. Em seguida, as suspensões foram homogeneizadas e colocadas para congelar a – 20°C. Assim que ocorreu o congelamento, as mesmas foram descongeladas a temperatura ambiente e foram homogeneizadas durante 2 minutos, para então serem utilizadas na PCR.

A identificação e diferenciação das espécies de leveduras foi realizada pela metodologia de PCR-RFLP da região ITS de acordo com o procedimento descrito por Guillamón *et al.* (1998). Para tanto, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') para amplificar um fragmento de tamanho entre 300 a 900 pb compreendendo as regiões ITS1, rDNA 5.8S e ITS2. A composição do meio reacional usado na reação de amplificação está descrito na Tabela 4.

As reações foram realizadas em termociclador BioRad PTC-100 (Califórnia, EUA). O programa utilizado foi o seguinte: um ciclo de desnaturação de 95°C por cinco minutos; 40 ciclos de 95°C por trinta segundos, 60°C por um minuto e 72 °C por um minuto; e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO REACIONAL PARA A REAÇÃO DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS rDNA.

Componentes	Concentração
Tris-HCl 200 mM	20 mM
KCl 500 mM	50 mM
Cloreto de magnésio 50 mM	1,5 mM
Nucleotídeos trifosfatados 1 mM	200 µM
Oligonucleotídeos iniciadores 20 µM	0,8 µM
<i>Taq</i> DNA polimerase 5 U/µl	1,5 U
DNA amostral	20 – 40 ng
Volume final	25 µL

A detecção dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% em solução tampão de TBE 1x (Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 2 mM). Uma alíquota de 5 µL do produto de PCR foi homogeneizada com 1,5 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, glicerol 30%) antes de ser depositada no gel. A separação dos *amplicons* foi realizada por eletroforese em sistema horizontal a 90 V com duração de 1 hora e 30 minutos. Como referência de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb (DNA *Ladder*, Invitrogen, Brasil).

O *amplicon* resultante foi digerido, de forma individual, com três endonucleases de restrição, sendo elas: *HaeIII* (5' GG↓CC 3'), *CfoI* (5' C↓GCG 3') e *HinI* (5' G↓CTNA 3'). Para a diferenciação das espécies do gênero *Hanseniaspora* ainda foi necessária a utilização das endonucleases *MboI* (5' GAAGA(N)₈↓ 3') e *DdeI* (5' C↓TNAG 3'). As clivagens enzimáticas seguiram as orientações do fabricante quanto ao tempo e ao meio reacional.

A detecção dos fragmentos gerados pela ação das enzimas foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 3% em solução tampão de TBE 1x. Todo o volume da reação, 10 µL, foi homogeneizado com 3,0 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, glicerol 30%) antes de ser aplicado no gel.

Após o término da eletroforese, a revelação dos *amplicons* ou do perfil de fragmentação deste, foi realizada por imersão do gel em brometo de etídeo a 0,5 µg.mL⁻¹ durante 15 minutos. A fotodocumentação foi realizada sob luz UV com comprimento de onda de excitação em 302 nm utilizando o programa Eagle Eye (Stratagene).

4.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO D1/D2 DO 26S rDNA

Quando a diferenciação genotípica não foi possível pela técnica de PCR-RFLP ou para confirmar um perfil de fragmentação, a identificação foi realizada também pelo sequenciamento do produto de PCR da região D1/D2 do 26S rDNA. A extração do DNA foi realizada como descrito no item 4.2. O par de oligonucleotídeos iniciadores

NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') e NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG

3') foram utilizados para a amplificação de um fragmento entre 400 – 600 pb (KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, 1998).

Após eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmar a amplificação dos produtos de PCR, os mesmos foram purificados utilizando o kit Illustra ExoProStar (Ge Healthcare). Para a reação de sequenciamento, utilizou-se o kit BigDye Terminator (Applied Biosystems) e optou-se pelo uso do oligonucleotídeo em sentido direto (*Primer Forward*) NL1 para todas as linhagens. Caso a sequência apresentasse baixa qualidade, o oligonucleotídeo em sentido reverso (*Primer Reverse*) NL4 seria utilizado para sequenciar a fita complementar. Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados utilizando 2,5 µL de EDTA 125 mM e 25 µL de etanol absoluto. Esta mistura foi homogeneizada com micropipeta, permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi imediatamente removido e a este foi adicionado 30 µL de etanol 70%. Esta mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi imediatamente removido e o sedimento foi seco em estufa a 37°C por 5 minutos. O sedimento seco foi dissolvido em 10 µL de formamida e desnaturado em termociclador por 95°C durante 2 minutos. As amostras foram colocadas em gelo por 2 minutos e submetidas ao sequenciamento (ABI PRISM 310, Applied Biosystems).

Os dados gerados no sequenciamento foram importados para o programa *Sequence Scanner* v 1.0 (Applied Biosystems). Este permite visualizar a qualidade da sequência e observar possíveis erros na sequência. A sequência foi submetida ao programa BlastN (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) presente em um banco de dados público do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, o NCBI (*Nacional Center of Biotechnology Information*). Esta ferramenta permite alinhar a sequência amostral a outras sequências depositadas neste banco de acordo com o seu grau de similaridade. Quando os alinhamentos resultaram em similaridade $\geq 98\%$ a identificação foi considerada bem sucedida, abaixo disso, tratam-se de espécies distintas (KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, 2003; GAYEVSKIY; GODDARD, 2012).

As sequências obtidas foram ainda alinhadas usando o programa Clustal X (versão 2.0) com o intuito de identificar regiões conservadas e variáveis entre as espécies de leveduras analisadas.

4.4 DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS

A sequência depositada no banco de dados GenBank sob o número de acesso KJ173775 foi utilizada como referência para o desenho dos iniciadores específicos para a espécie *Candida diversa*.

Para desenhar e analisar os iniciadores, *in silico*, foi utilizado o programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Estes foram alinhados com sequências de várias espécies de leveduras empregando o programa *BlastN* disponível em (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) para checar a especificidade dos mesmos para a referida espécie.

O meio reacional para esta PCR utilizou os componentes nas mesmas concentrações apresentadas na Tabela 2. As reações foram realizadas em termociclador ProFlex (Applied Biosystems, EUA). O programa utilizado foi o seguinte: um ciclo de desnaturação de 95°C por cinco minutos; 30 ciclos de 95°C por trinta segundos, 67,8°C por um minuto e 72°C por um minuto; e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

4.5 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR MALDI-TOF/MS

4.5.1 Preparo das Amostras

As leveduras foram avaliadas através da análise direta da colônia (SANTOS *et al.*, 2011) e extratos celulares também foram preparados e testados (MARKLEIN *et al.*, 2009). Para a análise direta da colônia, uma pequena quantidade da colônia recém-crescida (48 h de crescimento) foi transferida para a placa-alvo do equipamento formando uma fina camada no spot utilizado e, em seguida, foi recoberta com 1 µL da matriz ácido α -ciano hidroxicinâmico (CHCA, Bruker Daltonics, Brasil). Para a extração celular, preparou-se uma suspensão de células em água ultra-pura, com 48 horas de crescimento, na concentração aproximada de 10^8 células/mL utilizando o cartão de Wickerham como método para contagem celular (PFALLER *et al.*, 1988). Alíquotas de 300 µL desta suspensão foram transferidas para um tubo de polipropileno e, 900 µL de etanol

absoluto foram adicionados. A mistura foi submetida à homogeneização e centrifugação a 10.000 x *g* durante 2 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento, depois de seco a temperatura ambiente, foram adicionados 30 µL de ácido fórmico a 70% e 30 µL de acetonitrila. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e centrifugada nas mesmas condições anteriores. Em seguida, um µL do sobrenadante, diluído na proporção de 1:4 em água ultra-pura, foi transferido para um dos 96 poços da placa-alvo. Após seco, o extrato celular foi recoberto com um microlitro da matriz ácido CHCA ou ácido sinapínico (SA, Fluka, Brasil).

A matriz de CHCA foi constituída por uma solução saturada (10 mg.mL⁻¹) diluída em acetonitrila:água:ácido trifluoroacético 3% na proporção de 50:40:10 (v:v:v). A matriz de SA foi composta de uma solução saturada (10 mg.mL⁻¹) diluída em acetonitrila:água:ácido trifluoroacético 3% na proporção de 30:60:10.

4.5.2 Aquisição dos Espectros e Análise dos Dados

Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massa MALDI-TOF modelo MicroFlex LRF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) empregando laser de nitrogênio (337 nm) com 20-65% de intensidade e operando em modo de aquisição espiral. Os íons positivos foram obtidos utilizando aceleração de 20 Hz no modo linear e a amplitude de massa detectada foi de 2.000 a 20.000 Da. Para cada espectro 240 disparos de laser, divididos em 6 etapas de 40 disparos partindo de posições diferentes do alvo, foram coletados e analisados. Os espectros foram adquiridos no modo de aquisição automático e os picos detectados usando o algoritmo centróide com as configurações padrão do fabricante (sinal/ruído:2; limite mínimo de intensidade: 600; número máximo de picos: 300). A calibração do equipamento foi realizada com um padrão externo composto por um extrato proteico da bactéria *Escherichia coli* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

Para identificar um microrganismo desconhecido, o espectro adquirido foi importado para o programa MALDI Biotyper (versão 3.0, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e comparado frente a todos os espectros padrão presentes no banco de dados deste programa. Esta comparação está baseada na

identidade de correspondência entre a relação massa/carga (m/z) dos íons, a intensidade relativa e a frequência de cada pico. Ao final, o resultado da identificação microbiana é apresentado em uma tabela onde se verifica a espécie do microrganismo mais provável e o valor de log score que pode variar de 0 a 3. Valores de log score entre 2,3 – 3,0 indicam identificação altamente provável da espécie; entre 2,0- 2,29 indica identificação segura do gênero, provável identificação da espécie; entre 1,7 – 1,99 indica provável identificação do gênero; e entre 0,0-1,69 indica identificação não confiável em virtude da correspondência insuficiente entre o espectro da amostra e os espectros padrão.

O programa FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Alemanha) foi utilizado para a inspeção visual dos espectros, bem como para o processamento dos mesmos (suavização, normalização e/ou subtração da linha de base) para a apresentação visual ao longo deste trabalho. Este processamento dos espectros também é realizado pelo programa Biotyper previamente a comparação do espectro amostral com os espectros de referência presentes no seu banco de dados.

O programa mMass (versão 5.5.0) foi utilizado para transformar os sinais m/z dos espectros de massa em bandas simulando uma separação em gel (STROHALM *et al.*, 2008). Este programa foi ainda utilizado para buscar picos biomarcadores por meio da comparação da lista de sinais m/z entre as espécies de leveduras analisadas, sempre considerando uma variação de massa de ± 5 Da.

4.5.3 Implantação do Banco de Dados Suplementar

Para aquelas espécies que não constam no banco de dados Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), um espectro-padrão específico foi inserido em um banco de dados adicional ao comercial já existente. O espectro-padrão de cada espécie foi construído usando um compilado de, no mínimo, 20 espectros originados de replicatas biológicas. Para tanto, seis tubos contendo o crescimento microbiano em meio YEPD foram usados. Quatro extrações celulares individuais foram realizadas partindo do crescimento celular de cada tubo. Assim, um total de 24 extrações individuais foi obtido para cada microrganismo a ser inserido. Dos 24 espectros gerados, um mínimo de 20

espectros foi utilizado para gerar a lista de sinais m/z que compõem o espectro-padrão. A adição dos espectros-padrão foi realizada utilizando a ferramenta “criação de perfis de espectros de massa” (*Mass Spectra Profile (MSP) creation*) presente no programa Biotyper (versão 3.0) que compreende os parâmetros padrão estipulados pela Bruker (Frequência mínima desejada para o pico: 25%; Número de picos desejados para compor o MSP: 70).

Este Banco de Dados Suplementar foi subsequentemente utilizado para reavaliar todos os espectros coletados e não identificados pelo banco de dados comercial Biotyper.

4.5.4 Análises Estatísticas

Oito espécies de leveduras distintas tiveram seus espectros de massa coletados em sextuplicatas para a avaliação da qualidade espectral. Para tal empregaram-se os parâmetros (a) média do número de picos, (b) relação sinal:ruído média dos 15 picos mais intensos (c) resolução média dos 15 picos mais intensos. As médias obtidas foram analisadas por análise de variância (ANOVA) corrigida pelo teste Tukey a um nível de significância de 95% ($p < 0,05$) e 99% ($p < 0,01$). Estas análises foram efetuadas em Excel suplementado com o aplicativo PHStat2 (versão 3.0.4).

Para as análises de precisão instrumental e repetitividade, duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram empregadas. A precisão instrumental foi avaliada com o uso do mesmo extrato celular depositado em seis spots diferentes na placa-alvo. Para as análises de repetitividade, cada linhagem foi submetida a seis extrações celulares distintas e cada uma das extrações foi depositada uma única vez na placa-alvo. Para ambas as análises, foi calculado o coeficiente de variação médio a partir dos valores de intensidades dos 15 picos mais intensos.

A eficácia do Banco de Dados Suplementar para a diferenciação das espécies adicionadas foi avaliada por análise multivariada. Para cada uma das espécies, dez espectros foram utilizados para construir a matriz usada nesta análise estatística. Depois do processamento espectral, os quinze íons mais abundantes foram selecionados para cada espectro a ser utilizado. Cada um dos espectros foi comparado com a listagem de todos os picos presentes para gerar a matriz

quadrática, empregando um desvio de m/z de ± 5 Da. A matriz foi composta de 110 linhas e 233 colunas, sendo que as linhas representam as amostras e as colunas os sinais m/z . Esta comparação de picos foi realizada com o auxílio do programa mMass (versão 5.5.0) com o uso da ferramenta “*Compare Peak Lists*”. Nesta, os picos que estavam presentes receberam o número “1” e aqueles que estavam ausentes receberam o número “0”. A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) foi realizada com o programa Matlab 7.0.1 (Massachusetts, EUA).

Todas as espécies contidas na Coleção analisada foram submetidas a uma análise de agrupamento baseado na comparação da listagem de picos que forma cada MSP. O dendrograma foi gerado usando uma função estatística presente no Matlab 7.1 (The MathWorks Inc.) integrado ao programa MALDI Biotyper. Os parâmetros utilizados foram a medida de Distância Euclidiana e o método do encadeamento completo (*Linkage Complete*). Valores mais próximos de 0 indicam baixo grau de dissimilaridade (*perfect match*) e, quanto mais próximo de 1000, maior a dissimilaridade (*no match*).

4.6 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS LEVEDURAS DA COLEÇÃO

As análises microscópicas em campo escuro foram realizadas em microscópio (Zeiss, Alemanha) com objetiva de 10X, com condensador de contraste de fase, objetiva Ph3 Planapo 100/1.3 de imersão e com optovar de magnitude 2. As imagens foram registradas com um aumento de 2000x.

Já as análises microscópicas em campo claro foram realizadas em microscópio Eclipse E200 (Nikon, xxx) com objetiva E Plan 40x/0.65. Estas imagens foram obtidas com o intuito de adicionar a barra de referência de tamanho, a qual no outro microscópio não foi possível adicionar. As imagens foram coletadas utilizando o programa de imagens Dinolite Digital Microscope (versão 3.3.0.0) utilizando um aumento de 400x.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR BIOLOGIA MOLECULAR

5.1.1 Otimização da PCR com os Iniciadores ITS1 e ITS4

Regiões espaçadoras entre a subunidade menor e a maior do rDNA como a região dos espaçadores transcritos internos (ITS), e o espaçadores não-transcritos (NTS), são altamente variáveis intra e interespecie (COUTO *et al.*, 1996). Sendo assim, a identificação molecular das leveduras presentes na coleção do CNPUV foi iniciada utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 por serem amplamente empregados para identificação de leveduras (WHITE *et al.*, 1990; GUILLAMÓN *et al.*, 1998; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; HIERRO *et al.*, 2004; PHAM *et al.*, 2011).

Primeiramente, foi avaliada a melhor temperatura de pareamento para os iniciadores em questão, considerando que, segundo a fabricante Sigma-Aldrich as temperaturas de pareamento ótimo para os iniciadores ITS1 e ITS4 eram respectivamente 68,5°C e 61,5°C. No entanto, segundo o programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), as temperaturas recomendadas eram 64°C e 57,8°C, respectivamente. Os testes foram realizadas em temperaturas entre 55 e 65°C utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97. A temperatura de 60°C foi a escolhida pois apresentou o melhor resultado (Figura 3) amplificando o fragmento de tamanho esperado em maior concentração em relação às demais condições e sem bandas inespecíficas. O *amplicon* apresentou aproximadamente 880 pb como esperado para a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, segundo Guillamón *et al.* (1998).

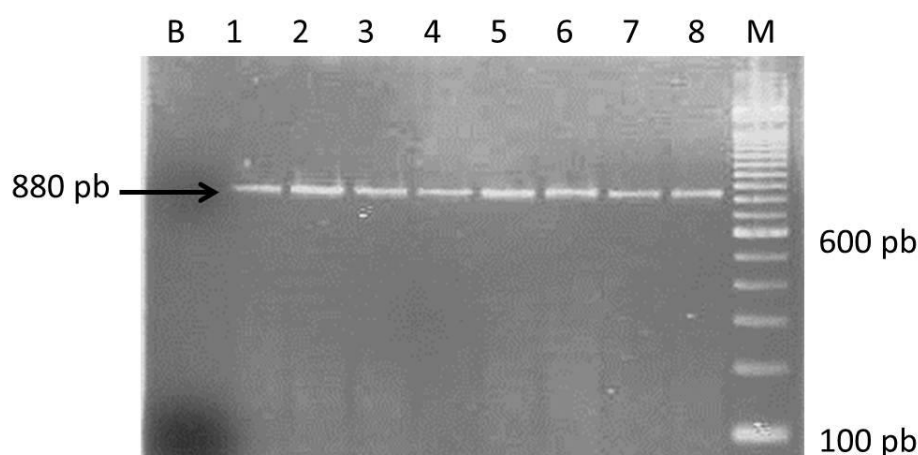


FIGURA 3- AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO PARA OS PRIMERS ITS1 E ITS4.

Eletoforese em gel de agarose a 1%. Linhas: (B) branco; (M) marcador de 100 pb (Invitrogen); (1 a 8) DNA da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT/97 amplificado em diferentes temperaturas de pareamento: 59°C, 60°C, 57°C, 62°C, 58°C, 63°C, 55°C e 65°C, respectivamente.

Com a temperatura de hibridização definida, o próximo passo foi otimizar a concentração dos componentes da PCR de forma a obter o melhor rendimento para o produto de PCR. Condições distintas para a reação de amplificação foram testadas e as cinco melhores estão apresentadas na Tabela 5.

TABELA 5 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA PCR PARA A REGIÃO DO rDNA COM OS OLIGONUCLEOTÍDEOS ITS1 E ITS4.

Componentes	A	B	C	D	E
Tris-HCl (mM)	20	20	20	20	20
KCl (mM)	50	50	50	50	50
MgCl (mM)	2,5	1,5	1,5	1,7	2,0
dNTP (μM)	100	200	200	160	120
Iniciadores (μM)	0,8	0,4	0,8	0,8	0,4
<i>Taq</i> polimerase (U)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
DNA amostral (ng)	20–40	20–40	20–40	20–40	20–40
Volume final	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL

A Figura 4 mostra os resultados obtidos permitindo-se concluir que a mistura reacional C foi a mais eficiente para a amplificação quando foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 por apresentar um produto de PCR mais expressivo. Sendo assim, estas condições foram estabelecidas para as demais amostras.

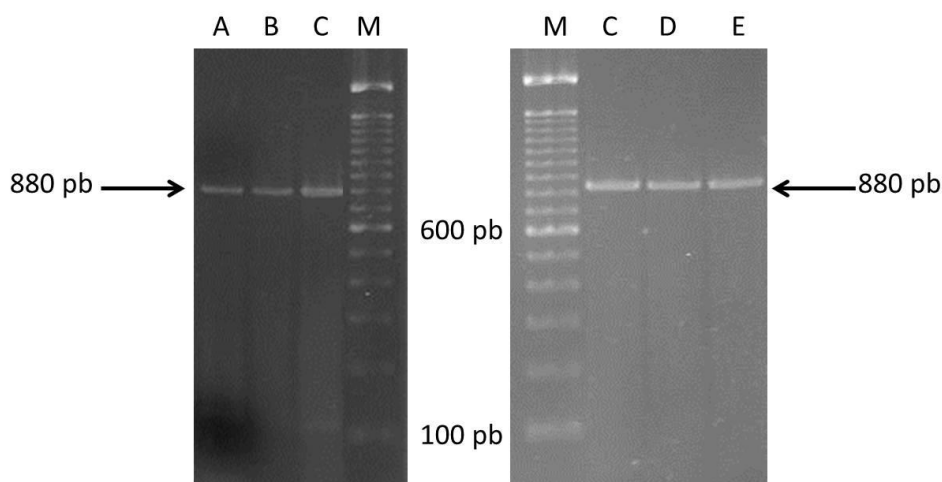


FIGURA 4- OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPONENTES DA REAÇÃO DE PCR UTILIZANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4.

Elektroforese em gel de agarose a 1%. Linhas: (M) marcador de 100 pb (Invitrogen); (A, B, C, D e E) produtos de amplificação obtidos com o DNA de *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 nas diferentes condições descritas na Tabela 4.

5.1.2 PCR-RFLP da Região ITS

Para a identificação das leveduras foi utilizada a técnica de PCR-RFLP. Neste processo o produto da amplificação com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 foi submetido à restrição enzimática utilizando as endonucleases *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*. Apenas o tamanho do amplicon resultante não é suficiente para discriminar as espécies de leveduras, visto que muitas delas apresentam a mesma quantidade de pares de base. Na Tabela 6, por exemplo, as espécies *Pichia kluyveri* e *Issatchenkia hanoiensis* apresentaram produto de PCR em 450 pb. Da mesma forma, as espécies *Sporidiobolus ruineniae* e *Sporidiobolus pararoseus* apresentaram amplicon idênticos em 600 pb.

Nas Figuras 5, 6 e 7, estão apresentados os resultados do RFLP com o produto da PCR da região ITS, com as três endonucleases utilizadas, para as 20 de um total de 21 espécies de leveduras encontradas na Coleção de Leveduras analisada. A espécie *Candida diversa*, também presente na Coleção, não apresentou amplificação com os iniciadores ITS1 e ITS4 e, portanto, não se encontra representada nas figuras supracitadas.

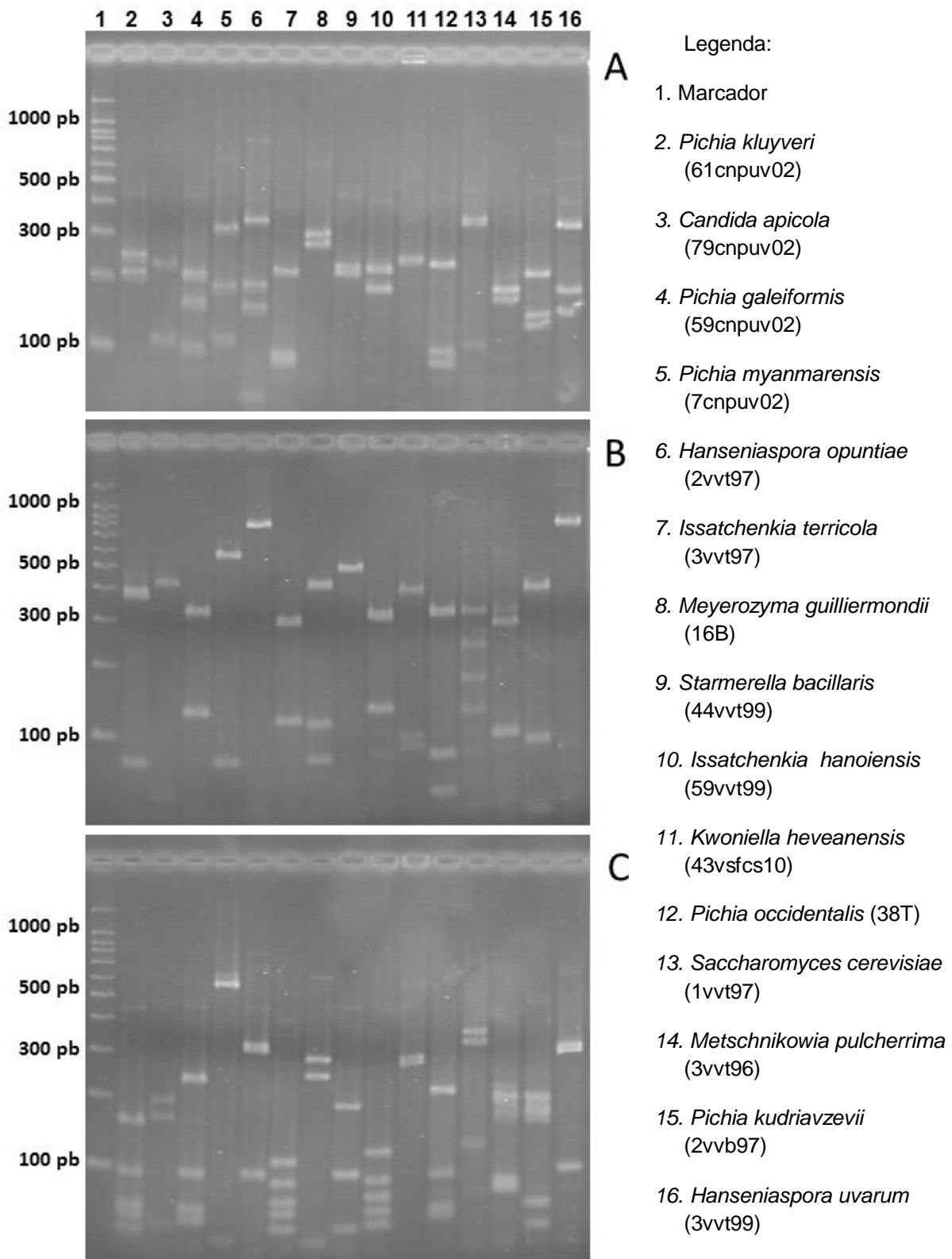


FIGURA 5- PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO UTILIZANDO AS ENZIMAS *HinfI* (A), *HaeIII* (B) E *CfoI* (C).

Géis de agarose a 3%. Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen). Géis corados com brometo de etídeo.

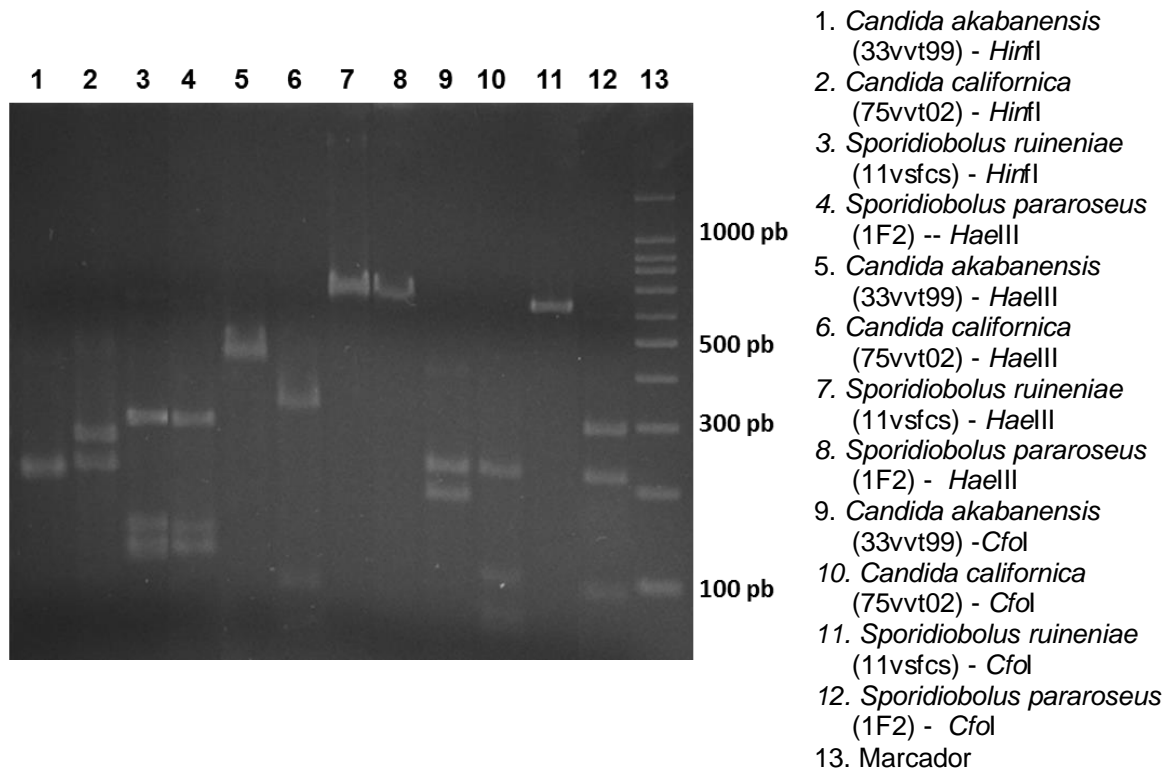


FIGURA 6 - PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DAS ESPÉCIES *Candida akabanensis*, *Candida californica*, *Sporidiobolus ruineniae* E *Sporidiobolus pararoseus* UTILIZANDO A ENZIMA *Hinf*I, *Hae*III E *Cfo*I.

Gel de agarose a 3%. Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen). Gel corado com brometo de etídeo.

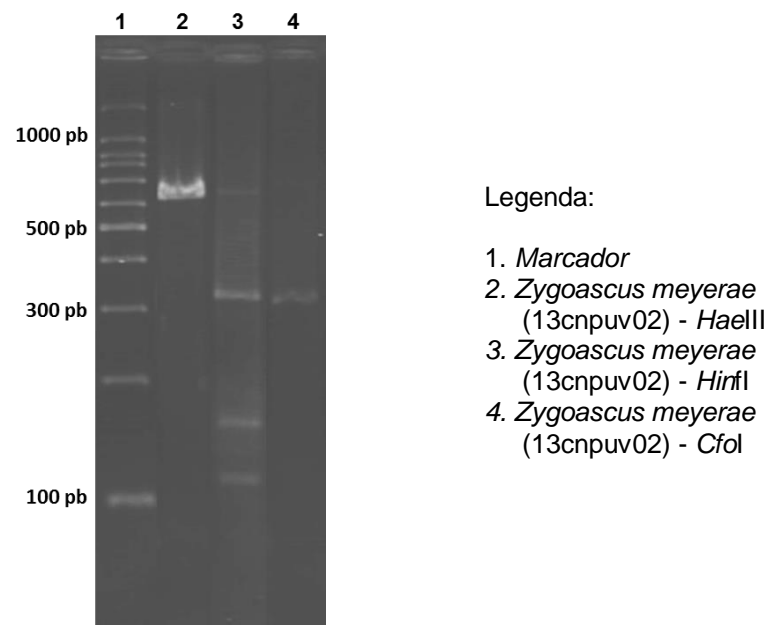


FIGURA 7 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DA ESPÉCIE *Zygoascus meyerae* UTILIZANDO A ENZIMA *Hinf*I, *Hae*III E *Cfo*I.

Gel de agarose a 3%. Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen). Gel corado com brometo de etídeo.

Os padrões de restrição encontrados foram comparados com os dados existentes na literatura para efetuar a identificação das espécies (GUILLAMÓN *et al.*, 1998; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; GRANCHI *et al.*, 1999; FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 2000; SABATE *et al.*, 2002; PHAM *et al.*, 2011; SETTANNI *et al.*, 2012; WANG, C.; LIU, 2013). Estudos de identificação baseados em técnicas de PCR-RFLP relatam a observação de diferentes tamanhos de *amplicons* e, também, a existência de perfis de restrição distintos quando outras linhagens são analisadas dentro de uma mesma espécie (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; PHAM *et al.*, 2011). Assim, a Tabela 6 compila os tamanhos dos produtos de PCR e dos fragmentos de restrição das 21 espécies de leveduras analisadas bem como apresenta os resultados de outros estudos científicos para as mesmas espécies com o intuito de comparação. A variabilidade intraespecífica fica evidente no presente estudo, pois algumas linhagens avaliadas apresentaram perfis de restrição diferentes quando comparado com outras linhagens descritas na literatura conforme discutido abaixo.

As leveduras da espécie *Sporidiobolus pararoseus* avaliadas apresentaram três fragmentos (300, 230 e 90 pb) quando clivada pela enzima *CfoI*. A linhagem CECT 10153 (*Spanish Type Culture Collection*) avaliada por ESTEVE-ZARZOSO *et al.* (1999), no entanto, apresentou apenas dois fragmentos (320 e 310 pb). Da mesma forma, as leveduras da espécie *Pichia galeiformis* identificadas apresentaram fragmentos distintos com a clivagem utilizando *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI* quando comparados a outros estudos na literatura (VILLA-CARVAJAL; QUEROL; BELLOCH, 2006; RODRÍGUEZ-BENCOMO *et al.*, 2009; MUCCILLI *et al.*, 2011).

A espécie *Pichia occidentalis* apresenta-se com diferentes tamanhos de produto de PCR da região ITS1-2 na literatura e, conseqüentemente, diferentes perfis de restrição. Os produtos de PCR das linhagens aqui estudadas estão de acordo com o relato de SABATE *et al.* (2002), apresentando *amplicons* na região de 480-500 pb. Entretanto, como apontado na Tabela 6, o estudo de GUILLAMÓN *et al.* (1998) apresentou um produto de PCR com 610 pb.

A espécie *Issatchenkia hanoiensis* teve seu padrão de ITS-RFLP demonstrado por HIERRO *et al.* (2006), no entanto, as leveduras desta espécie analisadas no presente estudo apresentaram um perfil de restrição diferente para as endonucleases *CfoI* e *HinfI*.

Esta variabilidade intraespecífica que resulta em perfis de restrição distintos foi também observada para a espécie *Candida apicola*. Os perfis obtidos neste estudo estão de acordo com o relato de SETTANNI *et al.* (2012), apresentando tamanhos de amplicon entre 490-500 pb. Por outro lado, estão em desacordo com o estudo de ESTEVE-ZARZOSO *et al.* (1999) que descreve produtos de PCR com 750 pb.

Quanto à espécie *Kwoniella heveanensis*, seu perfil ITS-RFLP foi apresentado por LV *et al.* (2013), contudo pequenas diferenças foram encontradas no tamanho dos fragmentos quando comparados com as leveduras analisadas neste estudo (Tabela 6). Esta espécie não é tão comumente encontrada como pertencente à microbiota da uva, tendo sido descrita uma vez em bagaços de uva (BOVO *et al.*, 2009), na fermentação de arroz (LV *et al.*, 2013) e em folhas de morango (DEBODE *et al.*, 2013).

Em contrapartida, as espécies *Starmerella bacillaris*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia kluyveri* e *Saccharomyces cerevisiae* encontradas na Coleção de Levedura analisada demonstraram perfis de restrição muito similares com os descritos na literatura (GUILLAMÓN *et al.*, 1998; GRANCHI *et al.*, 1999; FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 2000; DIAS *et al.*, 2003; STRINGINI *et al.*, 2008; PHAM *et al.*, 2011; SETTANNI *et al.*, 2012; WANG, C.; LIU, 2013).

O perfil de restrição para as espécies *Pichia myanmarensis*, *Candida akabanensis*, *Zygoascus meyeerae*, *Sporidiobolus ruineniae* e *Candida californica* não foram encontrados na literatura para comparação, sendo este, portanto, o primeiro relato.

TABELA 6 - TAMANHO DOS AMPLICONS E DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DAS VINTE E DUAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS PRESENTES NA COLEÇÃO ANALISADA.

ESPÉCIES	Amplicon ITS (pb)	FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (pb)			REFERÊNCIAS
		<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	
1) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880 <u>880</u> 850 <u>880</u>	370, 325, 140 385,365 <u>375,325,150</u> 340,320,120	310, 220, 170, 125 <u>320,220,180,145</u> <u>325,230,170,125</u> <u>320,240,180,140</u>	370, 360, 120 365,155 <u>375,365,110</u> 390,390,100	Presente estudo GUILLAMÓN <i>et al.</i> (1998) FERNÁNDEZ-ESPINAR <i>et al.</i> (2000) PHAM <i>et al.</i> (2011)
2) <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	770 <u>770</u> 750	320, 315, 100 - 335,115	770 690 <u>750</u>	340, 180, 160 <u>340,200,170</u> 370,205,175,75	Presente estudo WANG, C.; LIU (2013) SETTANNI <i>et al.</i> (2012)
3) <i>Hanseniaspora uvarum</i>	770 <u>760</u> <u>770</u> <u>750</u>	320, 315, 100 <u>320,315,105</u> - 335,115	770 <u>760</u> 690 750	340, 190, 160 <u>360,200,180</u> <u>340,200,170</u> 370,205,175,75	Presente estudo GUILLAMÓN <i>et al.</i> (1998) WANG, C.; LIU (2013) SETTANNI <i>et al.</i> (2012)
4) <i>Zygoascus meyeriae</i>	650	320, 320	650	330,160,140	Presente estudo
5) <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	625 <u>625</u> <u>625</u>	300, 270, 40 <u>300,265,60</u> <u>300,265,60</u>	400, 120, 80 <u>400,115,90</u> <u>400,115,90</u>	310, 290 <u>320,300</u> <u>320,300</u>	Presente estudo DIAS <i>et al.</i> (2003) ESTEVE-ZARZOSO <i>et al.</i> (1999)
6) <i>Pichia myanmaensis</i>	620	580, 40	540, 80	320, 180, 120	Presente estudo
7) <i>Sporidiobolus ruineniae</i>	600	600	600	260,130,110,100	Presente estudo
8) <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	600 630	300,230,90 320,310	600 410,220	270,120,100 250,230,120	Presente estudo ESTEVE-ZARZOSO <i>et al.</i> (1999)
9) <i>Kwoniella heveanensis</i>	595 <u>595</u>	290, 285 278	370, 100, 90 358,97	250 <u>268</u>	Presente estudo LV <i>et al.</i> (2013)
10) <i>Pichia kudriavzevii</i>	500 <u>500</u> <u>500</u>	200, 180, 75,55 215, 190 <u>200,180,70,50</u>	370, 90, 50 400 <u>360,90,50</u>	230, 150, 130 230, 160 <u>220,150,130</u>	Presente estudo SETTANNI <i>et al.</i> (2012) PHAM <i>et al.</i> (2011)
11) <i>Pichia galeiformis</i>	490 450 <u>470</u>	230, 100, 70, 60 250,120,80 <u>230,100,60</u>	320, 140 325,90 310,90	200, 160, 100 260,220 230,200	Presente estudo BAUTISTA-GALLEGO <i>et al.</i> (2011) RODRÍGUEZ-GÓMEZ <i>et al.</i> (2010)

	<i>Amplicon ITS</i>	<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	
12) <i>Candida apicola</i>	490	200, 175	430	230, 120, 120	Presente estudo
	<u>490</u>	220,190,100	400,90	<u>230,130,130</u>	FRUTOS <i>et al.</i> (2004)
	<u>500</u>	205,175	<u>450</u>	<u>240,125</u>	SETTANNI <i>et al.</i> (2012)
	750	340,310,100	730	390,195,160	ESTEVE-ZARZOSO <i>et al.</i> (1999)
13) <i>Pichia occidentalis</i>	480	215, 100, 80, 80	300, 90, 90	240, 110, 100	Presente estudo
	<u>500</u>	<u>215,100,80</u>	<u>300,90,90</u>	<u>270,120,110</u>	SABATE <i>et al.</i> (2002)
	610	575	610	325	GUILLAMÓN <i>et al.</i> (1998)
14) <i>Starmerella bacillaris</i>	475	200, 100	475	240, 230	Presente estudo
	<u>475</u>	<u>210,110</u>	<u>475</u>	<u>235,235</u>	SETTANNI <i>et al.</i> (2012)
15) <i>Pichia kluyveri</i>	450	170,100,80	370,80	250,200	Presente estudo
	<u>450</u>	<u>175,115,80,80</u>	<u>370,80</u>	<u>250,200</u>	STRINGINI <i>et al.</i> (2008)
	<u>450</u>	175,115	<u>370,90</u>	<u>250,200</u>	VILLA-CARVAJAL <i>et al.</i> (2006)
16) <i>Issatchenkia hanoiensis</i>	450	130,95,80,70,60	300, 140	240, 190	Presente estudo
	<u>450</u>	150,120,90	<u>300, 150</u>	<u>250,210</u>	HIERRO <i>et al.</i> (2006)
17) <i>Candida californica</i>	430	220,90,50,40	330, 80	230,200	Presente estudo
18) <i>Issatchenkia terricola</i>	420	120,90,80,75,55	290, 120	220, 100,100	Presente estudo
	<u>416</u>	<u>120,95,78,71,58</u>	<u>290,120</u>	<u>225,100,84</u>	GRANCHI <i>et al.</i> (1999)
	<u>420</u>	125,100,90,70	<u>310,110</u>	225	SETTANNI <i>et al.</i> (2012)
	<u>430</u>	-	<u>290,130</u>	<u>225,105,105</u>	WANG, C.; LIU (2013)
19) <i>Candida diversa</i>	-	-	-	-	Presente estudo
	400	160,100,100	400	210,190	FRUTOS <i>et al.</i> (2004)
	450	160,100,100,90	410	220, 200	ESTEVE-ZARZOSO <i>et al.</i> (1999)
20) <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	390	210, 100, 95	285, 100	190,180	Presente estudo
	<u>400</u>	<u>200,90</u>	<u>300,100</u>	<u>200,180</u>	SETTANNI <i>et al.</i> (2012)
	<u>400</u>	<u>205,100,95</u>	<u>280,100</u>	<u>200,190</u>	SABATE <i>et al.</i> (2002)
	<u>390</u>	<u>210,100</u>	<u>285,100</u>	<u>200,190</u>	GUILLAMÓN <i>et al.</i> (1998)
21) <i>Candida akabanensis</i>	390	200, 180	390	200,190	Presente estudo

Os dados deste trabalho encontram-se em negrito.

Os dados similares (± 20 pb) ou idênticos encontram-se sublinhados.

Os dados diferentes encontram-se em formato convencional

Em relação às leveduras da espécie *Candida diversa*, a técnica de PCR-RFLP utilizando a região ITS para amplificação não foi bem sucedida para a identificação desta espécie, apesar de tentativas de otimização da reação de amplificação para este caso específico. Houve falha na amplificação de todas as leveduras desta espécie usando os iniciadores universais ITS1 e ITS4, provavelmente devido a polimorfismos que afetam a ligação dos iniciadores ao DNA. Esta dificuldade em amplificar o segmento completo da região ITS1-5.8S-ITS2 já foi descrita no estudo de DESNOS-OLLIVIER *et al.* (2006) para quatro leveduras da espécie *Madurella mycetomatis* sugerindo a presença de alterações nas sequências alvo da amostra. Em ambos os casos, as espécies *Candida diversa* e *Madurella mycetomatis* apresentaram amplificação quando o iniciador ITS1 foi substituído pelo ITS3, demonstrando que a falha na hibridização se encontrava na região do pareamento do iniciador no sentido direto.

O uso das enzimas *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI* foi bem sucedido para diferenciar quase todas as espécies analisadas, com exceção das espécies *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora opuntiae* pois elas apresentaram os mesmos tamanhos de fragmentos de restrição. WANG, C.; LIU (2013) conseguiram fazer a distinção destas espécies empregando as enzimas *MboI* e *DdeI*. Na tentativa de elucidar as espécies de *Hanseniaspora* utilizando PCR-RFLP, o presente estudo também avaliou a eficácia das enzimas *MboI* e *DdeI*, utilizando as linhagens já identificadas por sequenciamento *Hanseniaspora uvarum* 15VVB97 e *Hanseniaspora opuntiae* 2VVT97. O resultado para as linhagens utilizadas demonstrou que o uso de qualquer uma destas enzimas já possibilitaria a distinção entre as espécies *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora opuntiae* (Tabela 7). No entanto, ao revisar a literatura publicada até o momento foi verificado que o perfil de restrição encontrado no presente estudo para a *Hanseniaspora opuntiae* empregando a enzima *DdeI* foi muito similar ao perfil de restrição da *Hanseniaspora guilliermondii* apresentado por ESTEVE-ZARZOSO *et al.* (1999). Assim, optou-se pelo uso da endonuclease *MboI* como a opção mais segura para distinguir entre as espécies de *Hanseniaspora*. Além disso, CADEZ *et al.* (2003) demonstraram que o perfil de restrição da *Hanseniaspora guilliermondii* empregando a enzima *MboI* é muito diferente dos apresentados pelas outras duas espécies de *Hanseniaspora*.

TABELA 7 – TAMANHO DO AMPLICON E DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Hanseniaspora* EMPREGANDO AS ENDONUCLEASES *MbolI* E *DdeI*.

Espécie	Amplicon ITS (pb)	<i>MbolI</i> (pb)	<i>DdeI</i> (pb)	REFERÊNCIAS
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	770	390,340,120	300, 170, 90, 90 80	Presente estudo
	770	400,270,100	280,160,160, 80	WANG, C.; LIU (2013)
	750	380,270,100	-	CADEZ <i>et al.</i> (2003)
	750	-	300,180,95,90,85	ESTEVE-ZARZOSO <i>et al.</i> (1999)
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	770	420,390	380, 170, 90, 90	Presente estudo
	770	385,385	380, 170, 90, 90	WANG, C.; LIU (2013)
	750	380,270,100	-	CADEZ <i>et al.</i> (2003)
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	750	-	380,180,95,80	ESTEVE-ZARZOSO <i>et al.</i> (1999)
	750	270,200,100	-	CADEZ <i>et al.</i> (2003)

*Os resultados encontrados para as linhagens analisadas no presente estudo encontram-se em negrito. A espécie *Hanseniaspora guilliermondii* aqui mostrada não foi analisada por não fazer parte da Coleção em estudo. No entanto, seu perfil de restrição encontra-se descrito a título de comparação.

5.1.3 Sequenciamento de DNA da Região D1/D2

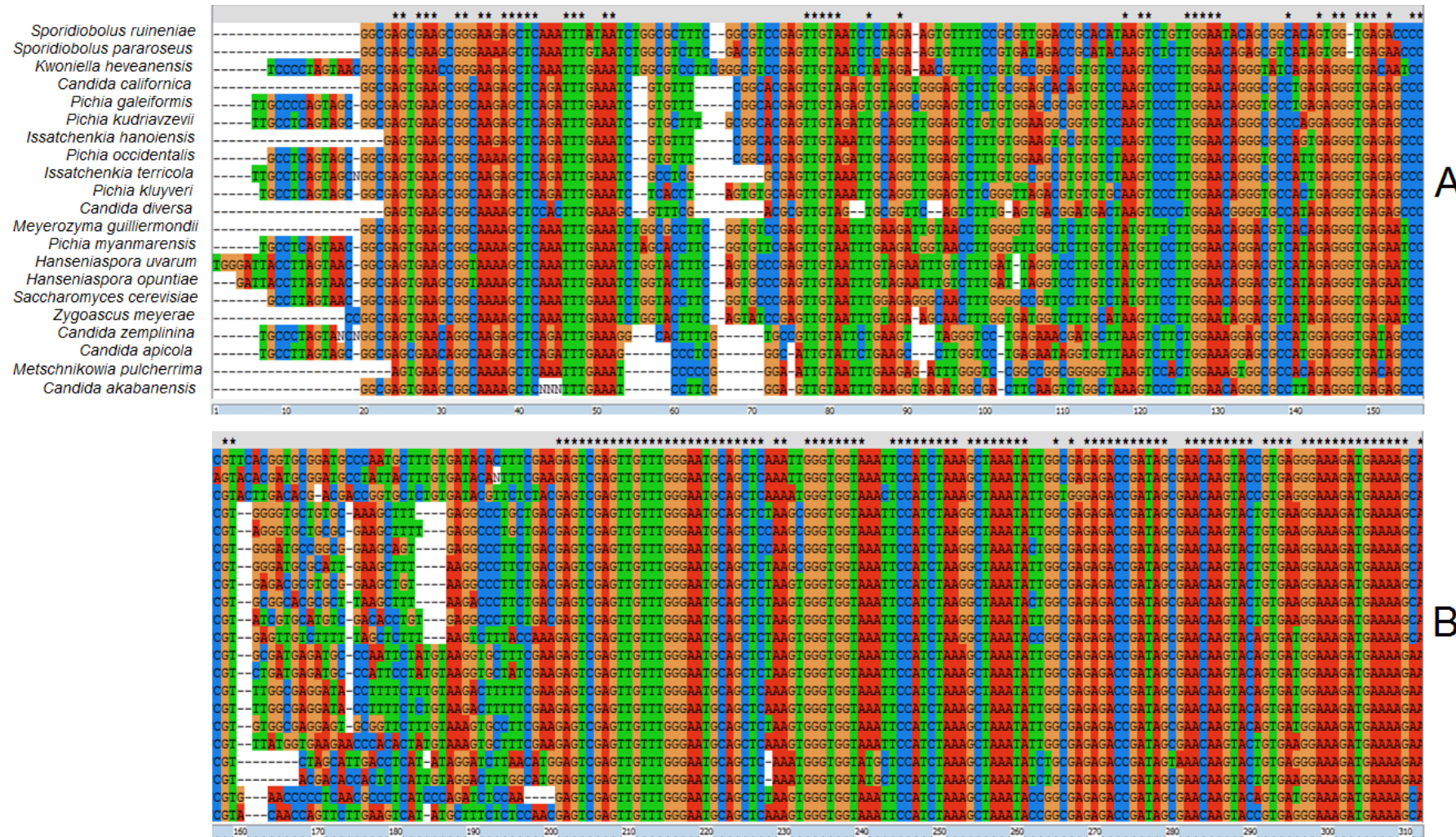
Como discutido acima, a variabilidade intraespecífica é comum e pode conduzir ao insucesso na identificação da linhagem por PCR-RFLP. Desta forma, a técnica de sequenciamento foi fundamental para garantir as corretas designações às linhagens estudadas. Pelo menos uma linhagem de cada grupo formado no ITS-RFLP teve sua espécie confirmada pelo sequenciamento genético da região D1/D2 do 26S rDNA.

Análises empíricas sugerem que se os isolados apresentarem similaridade <98% nesta região, tratam-se de espécies distintas (KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, 2003; GAYEVSKIY; GODDARD, 2012). Todas as espécies sequenciadas foram inseridas no GenBank e seus respectivos números de acesso encontram-se na Tabela 8. Estas sequências foram alinhadas para a identificação de regiões variáveis e conservadas dentro da região D1/D2 do gene 26S (Figura 8) entre as diferentes espécies de leveduras avaliadas. A região alinhada entre 200 a 358 pb apresentou-se a mais conservada entre as sequências.

TABELA 8 – ESPÉCIES DE LEVEDURAS SEQUENCIADAS (REGIÃO D1/D2), SUAS RESPECTIVAS LINHAGENS E NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK

Espécie	Linhagem	Nº acesso GenBank	Tamanho da sequência (pb)
<i>Issatchenkia terricola</i>	26VVT97	KJ173770	540
<i>Starmerella bacillaris</i>	44VVT99	KJ173771	482
<i>Kwoniella heveanensis</i>	43VSFCS10	KJ173772	572
<i>Candida apicola</i>	79CNPUV02	KJ173773	474
<i>Issatchenkia hanoiensis</i>	59VVT99	KJ173774	528
<i>Candida diversa</i>	1VVT99	KJ173775	503
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	2VVT97	KJ173776	561
<i>Pichia myanmarensis</i>	7CNPUV02	KJ173777	560
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	11VSFCS10	KP058518	554
<i>Candida californica</i>	75VVT02	KP058519	539
<i>Zygoascus meyeriae</i>	91T	KP058520	549
<i>Candida akabanensis</i>	33VVT99	KP058521	501
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	1F2/13	KP058522	552
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1XYL/12	KP058523	550
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41B	KP058524	520
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	3VVT96	KP058525	484
<i>Pichia kudriavzevii</i>	2VVB97	KP058526	558
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	15VVB97	KP058527	570
<i>Pichia galeiformis</i>	59CNPUV02	KP058528	547
<i>Picchia occidentalis</i>	38T	KP058529	549
<i>Pichia kluyveri</i>	13F1A	KP058530	561

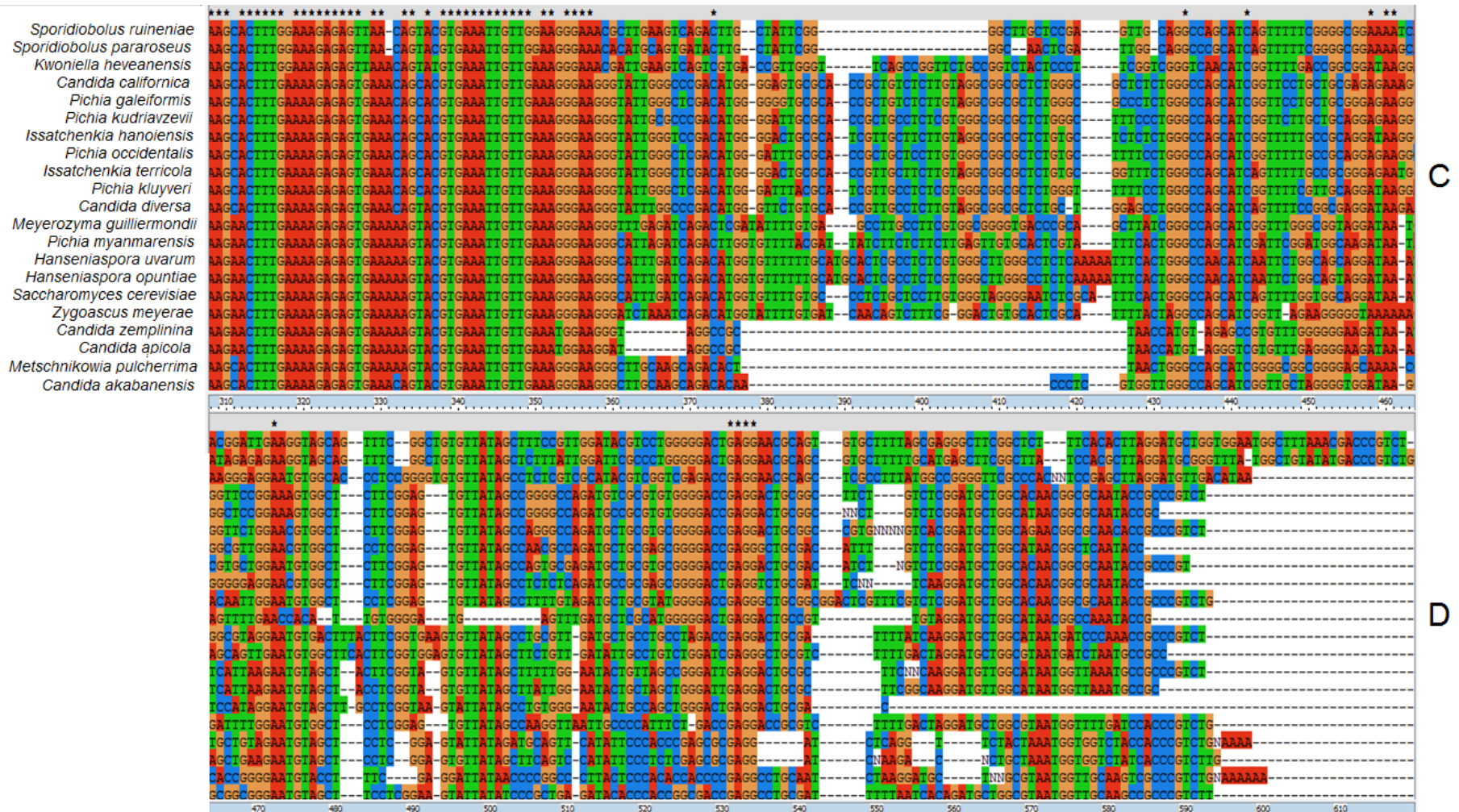
FIGURA 8 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS DIFERENTES ESPÉCIES DE LEVEDURAS SUBMETIDAS AO GENBANK



(A) Alinhamento de bases entre 1 a 147 pb; (B) Alinhamento de bases entre 148 a 312 pb

*O asterisco na primeira linha das figuras indica as regiões conservadas entre todas as sequências analisadas

-----CONTINUAÇÃO (FIGURA 8) -----



(C) Alinhamento de bases entre 313 a 463 pb; (D) Alinhamento de bases entre 464 a 618 pb

*O asterisco na primeira linha das figuras indica as regiões conservadas entre todas as sequências analisadas

Tendo em vista as constantes atualizações relacionada as nomenclaturas e identificações taxonômicas, no presente trabalho optou-se por respeitar as informações contidas na base de dados online Catálogo da Vida (*Catalogue of Life*, <http://www.catalogueoflife.org>), visto que as mesmas são revisadas anualmente. O Catálogo da Vida consiste no índice global mais confiável e abrangente de espécies atualmente disponíveis, contemplando mais de 1,5 milhões de espécies, juntamente com informações da sua hierarquia taxonômica.

A análise da sequência da linhagem 59cnpuv02 resultou em 99% de similaridade tanto em relação a espécie *Pichia galeiformis* quanto a *Pichia manshurica*. Ao investigar ambas as espécies por técnicas de hibridização DNA/DNA e comparação das sequências gênicas da região do 18S rDNA, UEDA-NISHIMURA; MIKATA (2001) demonstraram que *Pichia galeiformis* é na verdade um sinônimo da *Pichia manshurica*. Considerando as informações apresentadas no Catálogo da Vida, a espécie em questão será tratada sempre como *Pichia galeiformis* visto que este é a nomenclatura atualmente aceita.

A confirmação da espécie *Issatchenkia hanoiensis* se deu pelo sequenciamento da linhagem 59VVT99, cuja sequência obteve 99% de similaridade tanto com a espécie *Issatchenkia hanoiensis* quanto com a *Pichia sporocuriosa*. A primeira espécie foi descrita por THANH; HAI; LACHANCE (2003), enquanto a segunda foi descrita por PÉTER *et al.* (2000). *Issatchenkia* e *Pichia* são gêneros muito próximos e um estudo aprofundado das relações filogenéticas determinaram a partir de uma análise de sequências multigênicas que ambas as espécies são idênticas (KURTZMAN, CLETUS P.; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2008). Estes autores explicaram que quando a *Issatchenkia hanoiensis* foi descrita, ela não foi reconhecida como sendo uma linhagem da *Pichia sporocuriosa*, pois as sequências D1/D2 ainda não estavam disponíveis para esta última (KURTZMAN, CLETUS P.; ROBNETT; BASEHOAR-POWERS, 2008). *Issatchenkia hanoiensis*, nome atualmente aceito no Catálogo da Vida, também já foi isolada de vinhedos e vinhos da Nova Zelândia (GAYEVSKIY; GODDARD, 2012), das primeiras fases da vinificação com uvas Tempranillo na Espanha (HIERRO *et al.*, 2006), da fermentação espontânea de uvas Catalanesca na Itália (DI MARO; ERCOLINI; COPPOLA, 2007) e da variedade Castelão em Portugal (BALEIRAS COUTO; REIZINHO; DUARTE, 2005).

A espécie *Pichia myanmarensis* é uma nova espécie descrita por NAGATSUKA; KAWASAKI; SEKI (2005) que relataram grande similaridade com a espécie *Pichia anomala* quando comparadas as respectivas sequências da região D1/D2 26S rDNA. Esta similaridade foi verificada no presente estudo ao se efetuar o sequenciamento genético da linhagem 7CNPUV02 visto que a sequência de DNA obtida apresentou 100% de similaridade com a espécie *P. myanmarensis* e, 99% para a espécie *Pichia anomala*.

A espécie *Starmerella bacillaris* tem como sinônimo *Candida zemplinina* conforme indicado recentemente pelo estudo de DUARTE *et al.* (2012). Sendo assim, a linhagem 44VVT99 que foi submetida ao sequenciamento obteve 98% de similaridade tanto com linhagens de *Starmerella bacillaris* quanto com linhagens depositadas como *Candida zemplinina*. Considerando que a nomenclatura atualmente aceita é a primeira, todas as linhagens desta espécie serão designadas como *Starmerella bacillaris*.

A espécie *Cryptococcus heveanensis* era anteriormente apresentada como uma espécie de levedura imperfeita, ou seja, não apresentava estágio sexuado (KREGER-VAN RIJ, 1984). No entanto, o estudo de SUN *et al.* (2011) demonstrou que esta espécie também possui uma forma teleomorfa (sexuada) denominada *Kwoniella heveanensis*. Desta forma o depósito no GenBank da sequência da linhagem 43VSFCS foi realizado na denominação *Kwoniella heveanensis*.

As considerações apresentadas acima demonstram que a taxonomia é uma área do conhecimento muito dinâmica e, portanto, as denominações aceitas precisam ser revisadas com frequência para estarem atualizadas com o meio científico.

5.1.4 Desenho de iniciadores específicos para a espécie *Candida diversa*

Como discutido acima, a região ITS1-ITS2 das linhagens de *Candida diversa* presentes na Coleção analisada não foram amplificadas pelo uso dos iniciadores universais ITS1 e ITS4. Artigos científicos já relataram o sucesso na amplificação desta região em *Candida diversa* com o uso destes iniciadores (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; FRUTOS; FERNÁNDEZ-ESPINAR; QUEROL, 2004). Sendo assim, a técnica de biologia molecular disponível para a identificação das linhagens do

presente estudo foi a amplificação da região D1/D2 com o uso dos iniciadores NL-1 e NL-4 e , posterior sequenciamento desta região.

Considerando que o custo de um sequenciamento é mais elevado do que o custo de uma técnica de identificação por PCR ou PCR-RFLP, desenhou-se oligonucleotídeos específicos para a espécie *Candida diversa* utilizando a sequência obtida para a linhagem 1VVT99. Os iniciadores foram escolhidos com o auxílio da ferramenta *Primer3Plus* e estão apresentados na Tabela 9.

TABELA 9 - SEQUÊNCIA DA REGIÃO D1/D2 DA ESPÉCIE *Candida diversa* 1VVT99 E OS INICIADORES DESENHADOS A PARTIR DELA

Sequência	gagtgaagcggcaaaagctccactttgaaagcgtttcgacgcggtttagtgcggttc agtctttgagtgacggatgactaagtcctcctggaacggggtgccatagagggtgaga gccccgtgagttgtcttttttagct CTTTAAGTCTTTACCAAAGAGTCGAGTT gtttg ggaatgcagctctaagtgggtggttaaattccatctaaggctaaataccggcgagaga ccgatagcgaacaagtacagtgatggaaagatgaaaagcactttgaaaagagagtga aacagtacgtgaaattgttgaaaggggaagggtatttggcccgacatgggttctgtgc accgttgccctctttagggcggcgctctgctggagcctgggccagcatcagttttccg gcgag GATAAGAAGTTTTGAACCACATTGTG gggatgagtttgatgctcgcatgggg gactgaggactgccgtttaggatgctggcataacggccaaataccg
Iniciador Direto (28candiv3)	5'-CTTTAAGTCTTTACCAAAGAGTCGAGTT-3' Tm = 60,1°C G/C = 35,7%
Iniciador Reverso (28candiv4)	5'-CACAAATGTGGTTCAAACTTCTTATC-3' Tm = 60,2°C G/C = 34,6%

*Na sequência as letras maiúsculas indicam a sequência dos iniciadores.

** Tm = Temperatura de desnaturação

*** G/C = porcentagem de Guanina/Citosina

A especificidade destes iniciadores foram conferidas com o auxílio da ferramenta BlastN e os resultados apresentados na Figura 9 apresentaram um valor bem baixo para o *Expect(E)-value* para as linhagens de *Candida diversa* tanto para o iniciador direto (*E-value* = 7e-06) quanto para o iniciador reverso (*E-value* = 8e-05), atestando a alta especificidade dos mesmos. Quanto menor o *E-value*, mais significativo é a correspondência entre a sequência do iniciador e a sequência indicada pela ferramenta.

FIGURA 9 – ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES DESENHADOS PARA A ESPÉCIE *Candida diversa* UTILIZANDO A FERRAMENTA BLASTN

ESPECIFICIDADE INICIADOR DIRETO

Candida diversa strain 1VVT99 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	56.0	56.0	100%	7e-06	100%	KJ173775.1
Candida diversa strain LES010 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	56.0	56.0	100%	7e-06	100%	JQ672621.1
Candida diversa strain LE010 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	56.0	56.0	100%	7e-06	100%	JQ672608.1
Candida diversa strain LCE062 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	56.0	56.0	100%	7e-06	100%	JQ672603.1
Candida diversa strain LC062 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	56.0	56.0	100%	7e-06	100%	JQ672596.1
Candida diversa strain LC058 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	56.0	56.0	100%	7e-06	100%	JQ672595.1
Candida diversa 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	56.0	56.0	100%	7e-06	100%	EF620859.1
Candida diversa strain FN7S03 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	56.0	56.0	100%	7e-06	100%	EF460515.1
Candida diversa isolate G7 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	56.0	56.0	100%	7e-06	100%	DQ466528.1
Candida diversa 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	56.0	56.0	100%	7e-06	100%	U71064.1
Saturnispora ahearnii strain NRRL Y-7555 note type strain of Saturnispora ahearnii 26S ribosomal RNA gene	48.1	48.1	100%	0.002	96%	EF550217.1

Candida diversa strain 1VVT99 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KJ173775.1](#) Length: 503 Number of Matches: 1

Range 1: 139 to 166 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
56.0 bits(28)	7e-06	28/28(100%)	0/28(0%)	Plus/Plus

Query 1 CTTTAAGTCTTTACCAAGAGTCGAGTT 28
 |||||
 Sbjct 139 CTTTAAGTCTTTACCAAGAGTCGAGTT 166

ESPECIFICIDADE INICIADOR REVERSO

Candida diversa strain 1VVT99 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	52.0	52.0	100%	8e-05	100%	KJ173775.1
Candida diversa strain LES010 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	52.0	52.0	100%	8e-05	100%	JQ672621.1
Candida diversa strain LE010 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	52.0	52.0	100%	8e-05	100%	JQ672608.1
Candida diversa strain LCE062 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	52.0	52.0	100%	8e-05	100%	JQ672603.1
Candida diversa strain LC062 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	52.0	52.0	100%	8e-05	100%	JQ672596.1
Candida diversa strain LC058 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	52.0	52.0	100%	8e-05	100%	JQ672595.1
Uncultured Candida clone MAG_1844 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	44.1	44.1	100%	0.019	96%	JX408336.1
Uncultured Candida clone MAG_362 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	44.1	44.1	100%	0.019	96%	JX407583.1
Pithovirus sibericum isolate P1084-T, complete genome	38.2	38.2	73%	1.1	100%	KF740664.1
Dendroctonus ponderosae Seq01048752, whole genome shotgun sequence	38.2	38.2	73%	1.1	100%	APGK01048742.1
Uncultured Candida clone MAG_3969 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	1.1	96%	JX409267.1
Uncultured Candida clone MAG_3618 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	1.1	96%	JX409119.1
Uncultured Candida clone MAG_3505 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	1.1	96%	JX409064.1

Candida diversa strain 1VVT99 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KJ173775.1](#) Length: 503 Number of Matches: 1

Range 1: 405 to 430 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
52.0 bits(26)	8e-05	26/26(100%)	0/26(0%)	Plus/Minus

Query 1 CACAATGTGGTTCAAACTTCTTATC 26
 |||||
 Sbjct 430 CACAATGTGGTTCAAACTTCTTATC 405

Para verificar, na prática, a funcionalidade e a especificidade dos iniciadores desenhados, todas as reações de amplificação para a otimização da técnica incluíram uma linhagem da espécie *Saccharomyces cerevisiae* como controle negativo. Afinal os iniciadores foram desenhados para serem específicos para a espécie *Candida diversa*. Ao avaliar as temperaturas de pareamento entre 60 e 65°C utilizando o mesmo programa no termociclador que a PCR da região ITS, ou seja, com 40 ciclos, verificou-se a amplificação tanto da *Candida diversa*, como já esperado, quanto da *Saccharomyces cerevisiae* (Gel 1, Figura 10), a qual foi utilizada como controle negativo.

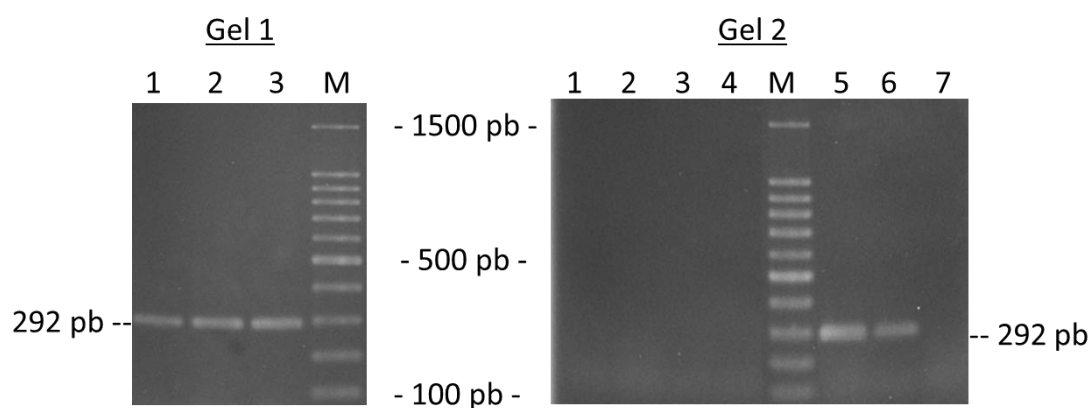


FIGURA 10 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR EMPREGANDO OS INICIADORES 28candiv3 e 4.

Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X. Gel corado com brometo de etídeo.

Gel 1 – Amplificação realizada com temperatura de hibridização em 65°C e 40 ciclos de amplificação. Colunas: (1) *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97; (2) *Candida diversa* 1VVT99; (3) *Candida diversa* 279T; (M) marcador de massa molecular 100 pb.

Gel 2 – Amplificação realizada com temperatura de hibridização em 67,8°C e 30 ciclos de amplificação. Colunas: (1) *Issatchenkia terricola* 24VVT97; (2) *Hanseniaspora uvarum* 15VVB97; (3) *Issatchenkia hanoiensis* 59VVT99; (4) *Pichia kluyveri* 13F1A; (M) marcador de massa molecular 100 pb; (5) *Candida diversa* 1VVT99; (6) *Candida diversa* 279T; (7) *Saccharomyces cerevisiae* 300T.

Quando temperaturas de hibridização superiores a 65°C e um menor número de ciclos de amplificação foram sendo testados, melhores condições para uma amplificação específica (temperatura de hibridização em 67,8°C e 30 ciclos de amplificação) foram obtidas. Apenas as espécies de *Candida diversa* foram amplificadas e com o tamanho de *amplicon* esperado, ou seja, 292 pb. Na Figura 8 (Gel 2) são apresentados os resultados da não amplificação das espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia terricola*, *Hanseniaspora uvarum*,

Issatchenkia hanoiensis e *Pichia kluyveri* utilizando as condições otimizadas para amplificação da espécie *Candida diversa*.

5.2 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

5.2.1 Otimização da Metodologia quanto ao Crescimento Celular

A espectrometria de massa MALDI-TOF tem mostrado ser um método rápido e preciso em comparação aos métodos tradicionais de identificação microbiana. Infelizmente, esta técnica sofre de baixa reprodutibilidade no que diz respeito à intensidade dos picos, uma vez que existem muitos fatores experimentais (variação do equipamento, tipo de matriz, concentração da amostra) e biológicos (idade da cultura, linhagem utilizada) que influenciam a qualidade do espectro (LAY JR, 2000; FENSELAU; DEMIREV, 2001; LAY, 2001; CHEN; LU; HARRINGTON, 2008).

Antes de dar início à identificação das linhagens de leveduras por espectrometria de massa MALDI-TOF, realizou-se a otimização de alguns fatores que poderiam influenciar na obtenção do espectro resultante. O primeiro fator analisado foi a influência de diferentes formas de crescimento das linhagens sobre o perfil espectral obtido. Conforme detalhado no item 4.1.3 foram avaliados o crescimento em ambiente compartilhado (A), o crescimento individual em tubo (B) e o crescimento em meio líquido e sólido (C). As duas primeiras formas de crescimento foram testadas para avaliar se existiria alguma interferência do metabolismo de uma linhagem sobre o crescimento da linhagem vizinha em virtude da proximidade das colônias na placa (A). A última forma de crescimento (C) foi testada para avaliar se as células criopreservadas apresentariam uma resposta espectral diferente caso fossem crescidas em meio líquido previamente ao crescimento em meio sólido.

Ao analisar os espectros da espécie *Saccharomyces cerevisiae* 21vvt97 (Figura 11A) percebe-se uma grande similaridade na intensidade e no perfil de sinais m/z dos espectros obtido com células crescidas em ambiente compartilhado e com células crescidas em meio líquido e sólido. Essas semelhanças podem ser visualizadas de forma mais clara quando os sinais espectrais são transformados em bandas como em uma eletroforese em gel (Figura 11B). Nesta figura, ainda é

possível visualizar que o espectro obtido de células crescidas em tubos individuais também compartilha a maioria dos sinais com os demais espectros, no entanto há uma diferença notável de intensidade em alguns sinais.

Juntamente com cada espectro (Figura 11A) foi adicionado o valor de log score resultante da identificação pelo programa Biotyper (Bruker Daltonics). Os três espectros apresentados obtiveram valores acima de 2.0 confirmando a identificação em nível de espécie. Estes resultados revelam que a proximidade das colônias nas placas (A) não interferiu no perfil espectral, bem como o crescimento em meio líquido (C) se mostrou uma etapa dispensável para a identificação em nível de espécie para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando a espectrometria de massa MALDI-TOF.

Assim como a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, outras duas espécies testadas, *Hanseniaspora opuntiae* e *Issatchenkia terricola*, também apresentaram resultados semelhantes, ou seja, não foi observada interferência significativa no perfil espectral associado à maneira de crescimento das células criopreservadas.

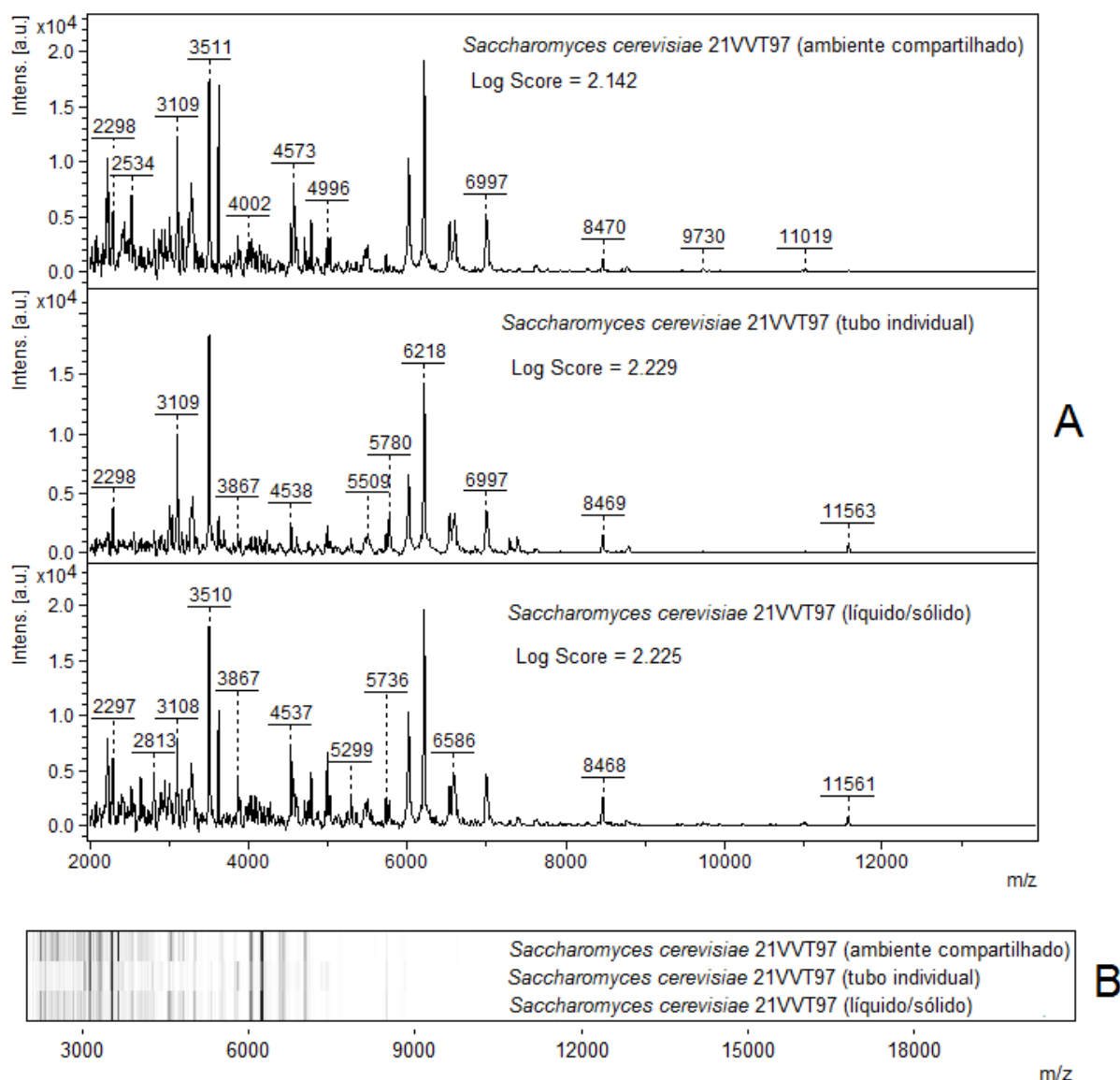


FIGURA 11 - (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE *Saccharomyces cerevisiae* 21VVT97 ORIGINADOS DE CÉLULAS REATIVADAS E SEM REATIVAÇÃO E, (B) SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL

1° espectro – extração celular resultante do crescimento em ambiente compartilhado (A);

2° espectro - extração celular resultante do crescimento individual em tubo (B);

3° espectro - extração celular resultante do crescimento em meio líquido e sólido (C).

A espécie *Pichia occidentalis* também foi avaliada e apresentou um resultado com alguma diferença com relação ao anterior. Para esta espécie, as diferenças entre as três formas de crescimento são mais sutis (Figura 12). No entanto, em relação ao valor de log escore, o perfil espectral proveniente de células crescidas em meio líquido e sólido (C) apresentou uma maior similaridade na comparação com o espectro-padrão existente no banco de dados Biotyper, conduzindo a obtenção de um valor de log escore acima de 2,0. Os dois primeiros espectros, apesar de muito

similares, demonstraram valores de log escore minimamente abaixo de 2,0, sendo 1,916 para o crescimento em placa e de 1,955 para o crescimento em tubos. Entretanto, ambas as amostras foram corretamente designadas como *Pichia occidentalis*, sem prejuízo para a identificação.

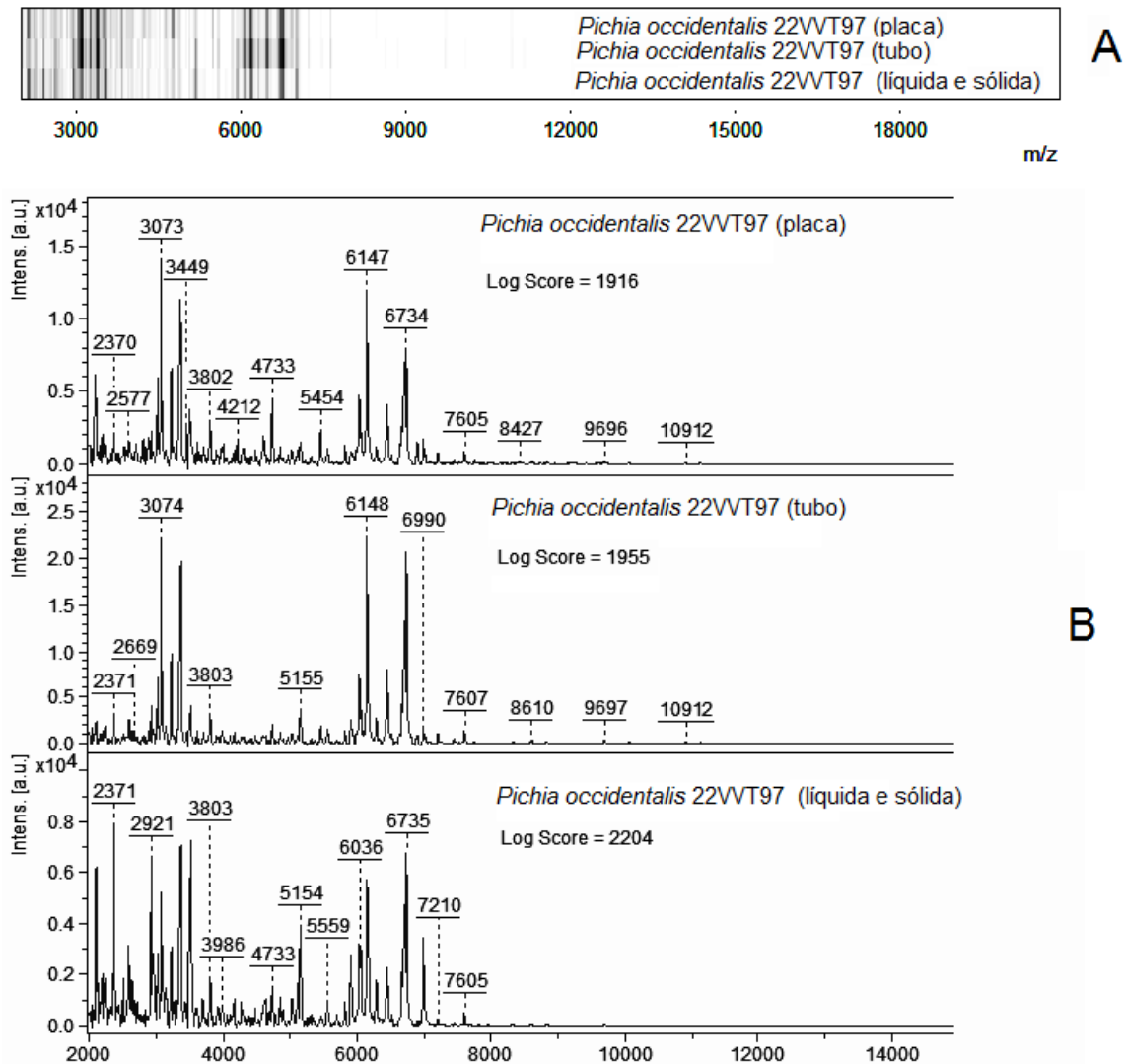


FIGURA 12 - (A) SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL E (B) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE *Pichia occidentalis* 22VVT97 ORIGINADOS DE CÉLULAS REATIVADAS E SEM REATIVAÇÃO

1° espectro – extração celular resultante do crescimento em ambiente compartilhado (A);

2° espectro - extração celular resultante do crescimento individual em tubo (B);

3° espectro - extração celular resultante do crescimento em meio líquido e sólido (C).

O fato de as células crescidas diretamente em meio sólido apresentarem perfis espectrais muito semelhantes às células que passaram por uma etapa adicional de crescimento em meio líquido, pode estar relacionado com o tempo de preservação das mesmas. As leveduras encontram-se criopreservadas há

aproximadamente cinco anos, um período considerado relativamente curto. Avaliando os resultados apresentados, as demais análises de identificação das leveduras presentes na Coleção foram realizadas com o protocolo de crescimento das células criopreservadas diretamente em placas de Petri (A), em virtude da economia de tempo e reagentes.

5.2.2 Otimização da metodologia quanto ao meio de cultura e o método de preparo da amostra

A metodologia de identificação taxonômica por MALDI-TOF MS está fundamentada nas características fenotípicas dos microrganismos. Sendo assim, seria esperado que ao se alterar as condições de cultivo do microrganismo, o espectro coletado apresentasse diferenças visíveis. Oito espécies de leveduras da Coleção foram escolhidas para avaliar a influência de dois métodos de preparo da amostra e de dois meios de cultura na qualidade do espectro adquirido. Em geral, a qualidade do espectro é avaliada levando em consideração fatores como número de picos, relação sinal:ruído (S:N), resolução e intensidade dos sinais (DREVINEK *et al.*, 2012; SCHUMAKER; BORROR; SANDRIN, 2012).

Em relação ao preparo da amostra, tanto o método de análise direta da colônia quanto o da extração proteica são comumente utilizados nas análises de MALDI-TOF MS para identificação microbiana. O primeiro, muito empregado para a identificação de linhagens bacterianas, tem a vantagem de ser extremamente rápido e de fazer uso de apenas uma pequena quantidade de células (GAIA; CASATI; TONOLLA, 2011). Em virtude da dificuldade de se obter espectros de alta qualidade para leveduras e fungos filamentosos com o uso do método de análise direta de células, geralmente se faz necessário o uso de um método de extração proteica ou de alguma técnica que aumente a qualidade do espectro de massa em termos de incremento no número de íons e uma melhora na razão S:N (QIAN *et al.*, 2008; MARKLEIN *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2011).

As Figuras 13 a 15 auxiliam na avaliação da qualidade espectral quanto à utilização do método da extração celular e da análise direta, ambos empregando células crescidas em meio YEPD. Enquanto as Figuras 16 a 18 demonstram a qualidade espectral de acordo com o uso de dois meios de cultura distintos. A qualidade espectral foi medida pelos parâmetros: (a) número de picos, (b) relação

senal/ruído média dos 15 picos mais intensos, e (c) média da resolução dos 15 picos mais intensos.

Inicialmente se avaliou a influência do método de preparo da amostra e foi possível observar que os parâmetros “média do número de picos” (Figura 13) e “relação S/N média” (Figura 14) apresentaram uma tendência de queda para o processo de análise direta da colônia quando comparado com o processo de extração celular. Para algumas espécies esta variação foi significativa segundo o teste estatístico de Tukey, como foi o caso da *Starmerella bacillaris* ($p < 0,05$), *Issatchenkia terricola* ($p < 0,01$) e da *Issatchenkia hanoiensis* ($p < 0,01$) para o parâmetro “média do número de picos”. Quanto à “relação S/N média” foi observado um aumento significativo para alguns casos e altamente significativo para outro com a técnica de extração celular. Para as espécies *Candida diversa*, *Starmerella bacillaris*, *Kwoniella heveanensis* e *Issatchenkia hanoiensis* o aumento da relação S/N média foi significativo ($p < 0,05$). Para a *Issatchenkia terricola* esse aumento foi altamente significativo ($p < 0,01$).

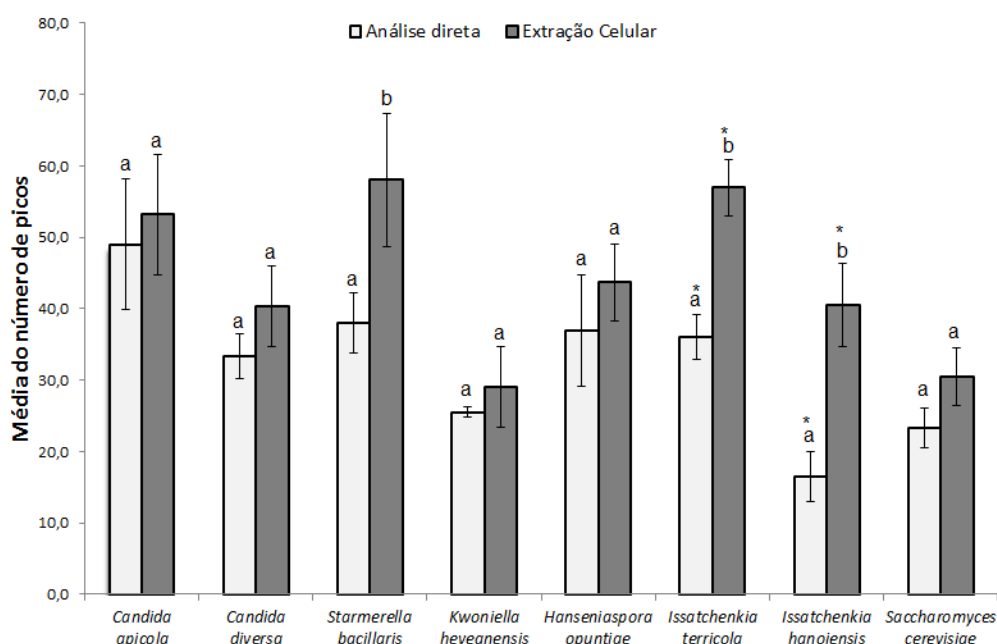


FIGURA 13 - MÉDIA DO NÚMERO DE PICOS PARA OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS FRENTE A DOIS MÉTODOS DE PREPARO DA AMOSTRA EMPREGANDO CÉLULAS CRESCIDAS EM MEIO YEPD.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). A presença do “*” indica diferença altamente significativa ($p < 0,01$).

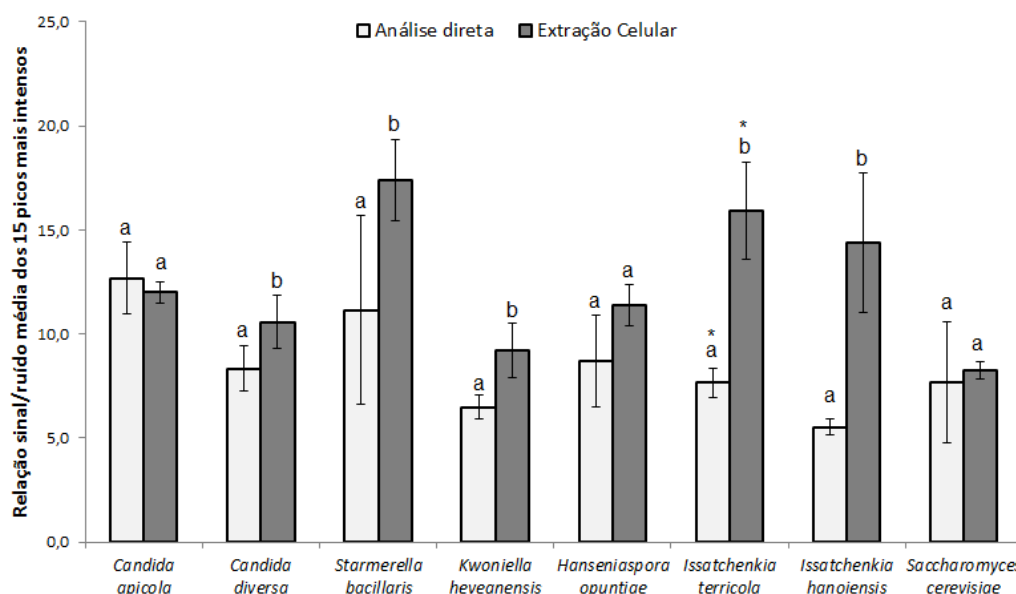


FIGURA 14 - RELAÇÃO SINAL/RUÍDO MÉDIA PARA OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS FRENTE A DOIS MÉTODOS DE PREPARO DA AMOSTRA EMPREGANDO CÉLULAS CRESCIDAS EM MEIO YEPD.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). A presença do “*” indica diferença altamente significativa ($p < 0,01$).

Em relação ao parâmetro “resolução média” (Figura 15), a inserção direta apresentou maior média em números absolutos para a maioria das espécies analisadas quando comparadas aos resultados do método de preparo da amostra por extração celular. Estas médias foram maiores e a diferença se mostrou altamente significativa ($p < 0,01$) para as espécies *Candida diversa*, *Kwoniella heveanensis*, *Issatchenkia hanoiensis* e *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto para *Issatchenkia terricola* foi significativa ($p < 0,05$) quando comparadas aos resultados obtidos com a extração celular. A extração celular somente foi maior em comparação com a análise direta para a espécie *Candida apicola*. A diferença para esta espécie foi altamente significativa ($p < 0,01$). De acordo com estas análises, foi possível observar que a espécie da levedura pode influenciar de forma relevante a qualidade espectral.

Em uma segunda etapa da avaliação da qualidade espectral, foi estimada a influência no perfil espectral de dois meios de cultura distintos. Para tanto, utilizou-se o método de extração celular, tendo em vista seu melhor desempenho para a qualidade espectral perante a maioria das espécies analisadas

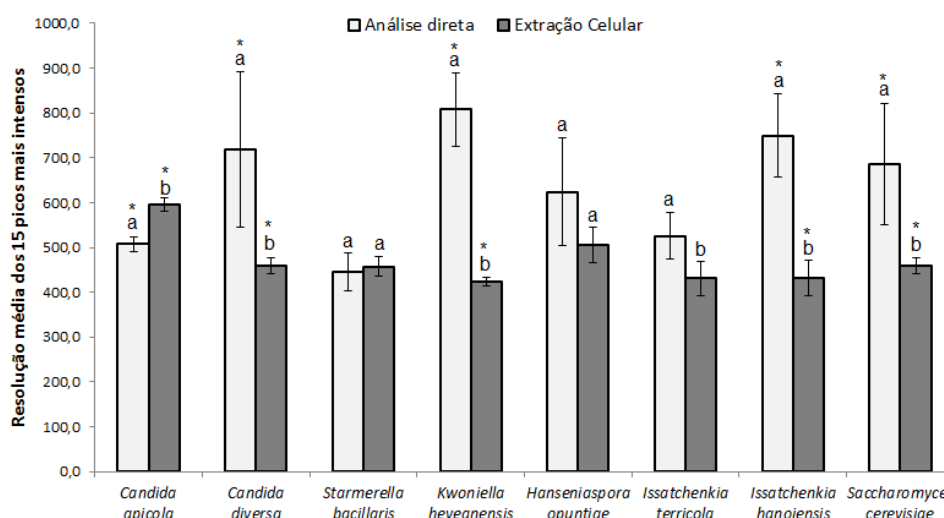


FIGURA 15 - RESOLUÇÃO MÉDIA DOS 15 PICOS MAIS INTENSOS PARA OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS FRENTE A DOIS MÉTODOS DE PREPARO DA AMOSTRA EMPREGANDO CÉLULAS CRESCIDAS EM MEIO YEPD.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). A presença do “*” indica diferença altamente significativa ($p < 0,01$).

No quesito “média do número de picos” notou-se uma média significativamente maior para as células de *Saccharomyces cerevisiae* ($p < 0,05$) e *Kwoniella heveanensis* ($p < 0,01$) crescidas em meio YEPD quando comparadas com as células crescidas em meio YM (Figura 16). Para a espécie *Candida diversa* a extração de células crescidas em meio YM apresentou espectros com quantidade de picos significativamente maior ($p < 0,05$) do que com o crescimento em meio YEPD.

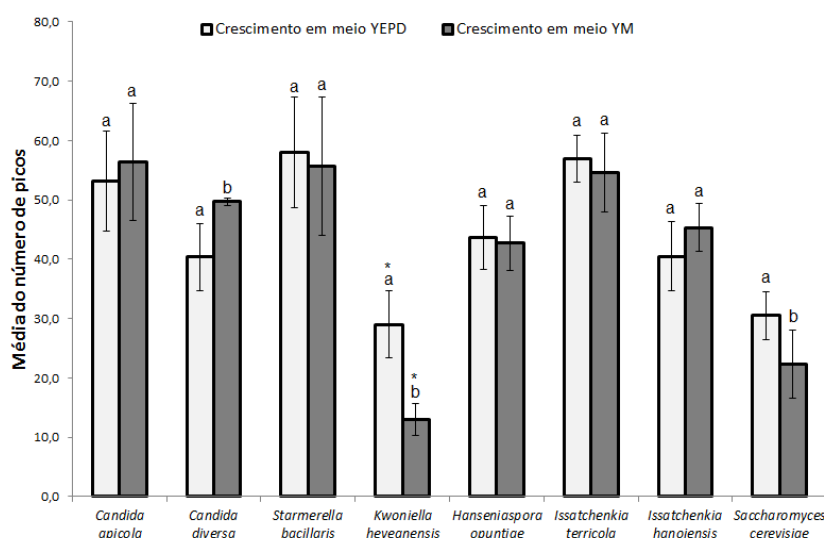


FIGURA 16 – MÉDIA DO NÚMERO DE PICOS PRESENTES NOS ESPECTROS DE OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS CRESCIDAS EM DOIS MEIOS DE CULTURA DISTINTOS E SUBMETIDAS À EXTRAÇÃO CELULAR.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). A presença do “*” indica diferença altamente significativa ($p < 0,01$).

Ao efetuar a comparação da influência dos meios de cultura no quesito “média da relação S:N” utilizando extração celular, notou-se uma média significativamente maior para as células de *Issatchenkia hanoiensis* ($p < 0,01$) e *Candida diversa* ($p < 0,01$) crescidas em meio YM quando comparada com as células crescidas em meio YEPD (Figura 17). Por outro lado, as células de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kwoniella heveanensis* crescidas em meio YEPD apresentaram médias significativamente maiores ($p < 0,01$) em detrimento das células crescidas em meio YM, em concordância com o que apresentaram para o parâmetro “média do número de picos”. Para as demais espécies não houve diferença significativa entre os diferentes meios de cultura.

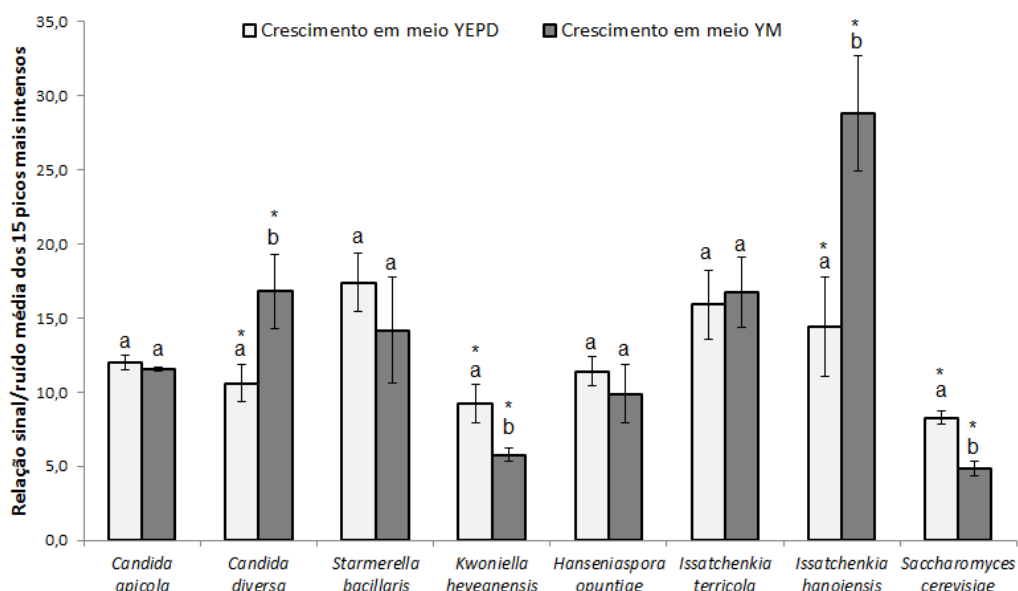


FIGURA 17 – RELAÇÃO SINAL/RUÍDO MÉDIA PRESENTE NOS ESPECTROS DE OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS CRESCIDAS EM DOIS MEIOS DE CULTURA DISTINTOS E SUBMETIDAS À EXTRAÇÃO CELULAR.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). A presença do “*” indica diferença altamente significativa ($p < 0,01$).

Quando foi feita a comparação da influência dos meios de cultura no quesito “resolução média” (Figura 18) utilizando extração celular, notou-se uma média significativamente maior ($p < 0,05$) apenas para as células de *Issatchenkia terricola* crescidas em YM em detrimento das células crescidas em YEPD. Para as demais espécies não houve diferença significativa entre os diferentes meios de cultura.

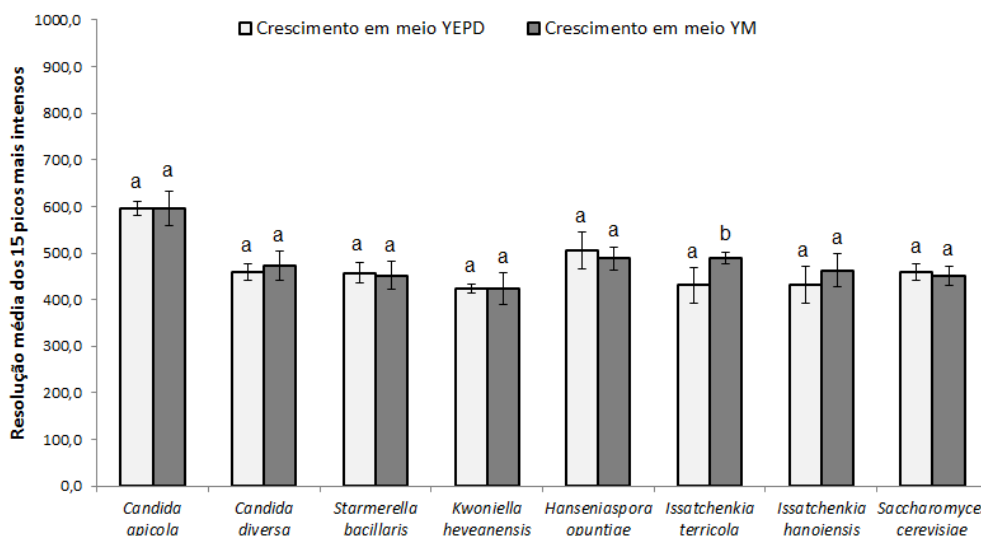


FIGURA 18 – RESOLUÇÃO MÉDIA APRESENTADA PELOS ESPECTROS DE OITO ESPÉCIES DE LEVEDURAS CRESCIDAS EM DOIS MEIOS DE CULTURA DISTINTOS E SUBMETIDAS À EXTRAÇÃO CELULAR.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). A presença do “*” indica diferença altamente significativa ($p < 0,01$).

Novamente, a influência da espécie da levedura ficou evidente nos resultados apresentados pelas Figuras 16 a 18. Em consonância com esta observação, outro estudo de identificação de leveduras por MALDI-TOF MS revelou ainda, ao estudar a influência do meio de cultura e diferentes temperaturas de incubação, que a influência destas variáveis sobre o espectro coletado era linhagem-dependente (QIAN *et al.*, 2008).

A avaliação da qualidade espectral pode ainda, de forma complementar, ser realizada pela comparação visual dos espectros. Os espectros da linhagem de *Kwoniella heveanensis* 43VSFCS10, obtidos por inserção direta e por extração celular, utilizando as leveduras crescidas nos meios YEPD e YM, estão apresentados na Figura 189A. É possível verificar diferenças notáveis entre o espectro coletado pelo método da inserção direta da colônia e os espectros da extração celular. A inserção direta gera menor intensidade de sinais e maior número de sinais de fundo. Estes sinais são oriundos, provavelmente, de restos celulares e da fragmentação dos componentes celulares (DOMIN; WELHAM; ASHTON, 1999).

Estas diferenças ficam mais claras na análise do gel dos sinais espectrais, como demonstrado na Figura 19B. Nesta figura confirma-se claramente o menor número de sinais m/z no espectro originado da análise direta das células bem como o melhor desempenho da extração celular originada do crescimento da espécie *Kwoniella heveanensis* 43VSFCS10 em meio YEPD em detrimento do meio YM, pois ganha-se em número e intensidade de sinais.

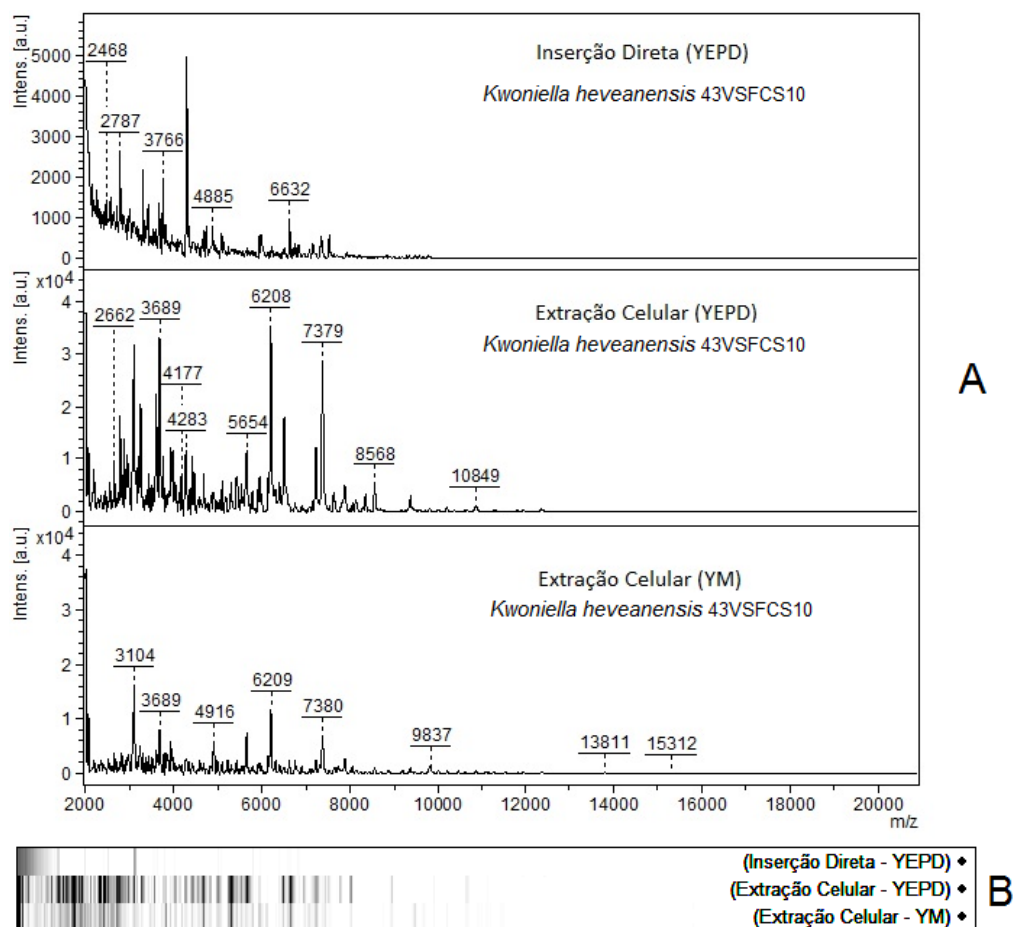


FIGURA 19- (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE *Kwoniella heveanensis* 43VSFCS10 E (B) SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL
 1º espectro - inserção direta de células cultivadas em meio sólido YEPD;
 2º espectro - extração celular resultante do crescimento em meio sólido YEPD;
 3º espectro - extração celular resultante do crescimento em meio sólido YM.

É importante ressaltar, no entanto, que os espectros obtidos a partir de células crescidas em YM também conduziram as corretas identificações das espécies pelo programa Biotyper. Isto porque os espectros obtidos das células crescidas em YEPD e em YM apresentaram uma grande quantidade de sinais m/z em comum (Figura 19), apesar das diferenças de intensidade. Em relação aos meios

de cultura, VALENTINE *et al.* (2005) também demonstraram que apesar das diferenças visuais existentes nos espectros de espécies bacterianas crescidas em quatro meios diferentes, não houve prejuízo à identificação taxonômica das mesmas. Embora a composição do meio influencie no perfil espectral, foi também observado que o uso de diferentes meios não compromete a identificação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (MOOTHOO-PADAYACHIE *et al.*, 2013) e nem a exatidão das identificações por MALDI-TOF MS (VAN VEEN; CLAAS; KUIJPER, 2010).

Em suma, os resultados estatísticos apresentados pelos parâmetros de qualidade espectral (Figura 13 a 19), apontaram a extração celular como sendo uma técnica superior à análise direta; e em relação ao meio de cultura a influência foi menor e foi bastante dependente da espécie empregada. Considerando que a Coleção analisada possui na sua maioria linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, o meio sólido YEPD foi o escolhido para o crescimento das linhagens por gerar espectros com maior número de sinais m/z , com maior intensidade e com melhor relação sinal/ruído.

Em concordância com o observado, LAU *et al.* (2013) relataram que melhores identificações foram alcançadas com a extração proteica, uma vez que esta técnica produz espectros com menos ruídos, sem interferências de sais e outros constituintes. Leveduras de origem clínica foram identificadas com sucesso pelo uso do método direto (SANTOS *et al.*, 2011), já em outros casos este também não demonstrou bons resultados (PINTO *et al.*, 2011). WIESER *et al.* (2012) ressaltaram que em alguns isolados com a parede celular mais espessa, como é o caso das leveduras, faz-se necessário o uso de um protocolo de extração para disponibilizar as proteínas ribossomais a fim de fornecer um perfil proteico mais detalhado e gerar resultados confiáveis. A ineficiência do método de análise direta de colônias também foi observada com a identificação de bactérias Gram positivas devido à maior espessura da camada de peptidoglicanos da parede celular quando comparada com a parede celular das bactérias Gram negativas (ALATOOM *et al.*, 2011).

5.2.3 Otimização da Metodologia quanto à Idade do Cultivo Celular

Outro fator que pode influenciar as análises do MALDI-TOF MS é a idade da cultura do microrganismo. Para elucidar o grau de influência da idade do cultivo, quatro leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (26B, 96B, K1 e 1VVT97) foram acompanhadas durante seis dias, tendo seus extratos celulares obtidos entre 24 e 144 horas. A maioria dos estudos relatando a identificação de leveduras pelo perfil molecular preconiza a idade de 48 horas de crescimento como o momento ideal para se efetuar a extração celular (MARKLEIN *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2011; MOOTHOO-PADAYACHIE *et al.*, 2013). No entanto, GOYER *et al.* (2012) demonstraram que tanto 48 quanto 72 horas de cultivo seriam adequados para a correta identificação de leveduras por MALDI-TOF MS. Corroborando com o autor supracitado, a Figura 20A apresenta o perfil espectral da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* 26B na qual, muitas similaridades são verificadas entre o espectro coletado com células em 48 h e 72h de crescimento. Ambos apresentaram um maior número de sinais m/z e maiores intensidades de sinais, como melhor visualizado na Figura 20B. Por outro lado, o primeiro e o quarto espectros presentes nesta figura apresentaram um número reduzido de picos, demonstrando que em 24 horas a cultura pode não apresentar um crescimento satisfatório para expressar uma boa concentração proteica para a obtenção do perfil espectral e em 144 horas algumas proteínas podem já ter sido degradadas. De acordo com WIESER *et al.* (2012), as colônias com mais de 48 horas de crescimento podem produzir sinais mais fracos e menos distinguíveis provavelmente devido à degradação de proteínas ribossomais.

Considerando os resultados obtidos e para padronizar a idade da colônia, as análises foram realizadas com crescimento de 48 horas.

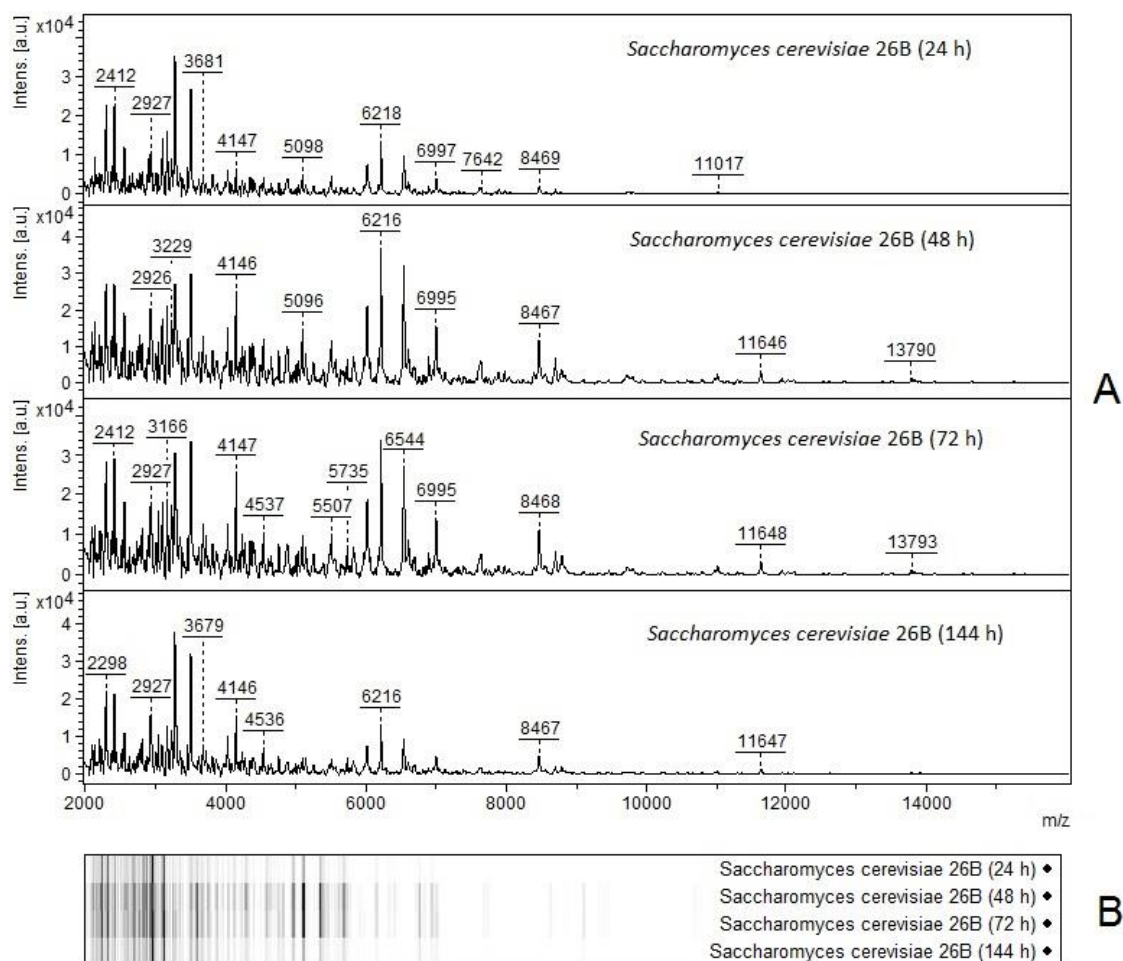


FIGURA 20- (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE *Saccharomyces cerevisiae* 26B EM DIFERENTES TEMPOS DE CRESCIMENTO E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL

1° espectro – obtido após 24h de crescimento em meio sólido YEPD;
 2° espectro - obtido após 48h de crescimento em meio sólido YEPD;
 3° espectro - obtido após 72h de crescimento em meio sólido YEPD;
 4° espectro - obtido após 144h de crescimento em meio sólido YEPD.

5.2.4 Otimização da Metodologia quanto à Escolha da Matriz e do Método de Deposição na Placa-Alvo

A próxima etapa investigada foi a escolha da matriz para ionização das amostras. Foram testadas a matriz CHCA e ácido sinapínico (SA). Para tanto, os extratos celulares de oito leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, escolhidas aleatoriamente, foram testados frente às duas opções de matriz. A aquisição do espectro utilizando a matriz SA (30-85% de intensidade do laser) exigiu um aumento na intensidade do laser comparado a matriz CHCA (30-65% de intensidade do laser). CHCA é uma matriz bem estabelecida como sendo apropriada

para peptídeos e pequenas proteínas, enquanto a SA apresenta melhor ionização de compostos em uma faixa relativamente maior de massa (SEDO; SEDLACEK; ZDRAHAL, 2011). Isto se confirma quando os espectros da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* 20VVT97, obtidos pela ionização com SA e com CHCA são comparados (Figura 21). Nesta figura, um maior número de sinais com S:N >2.0, entre 2.000 e 7.000 m/z, são encontrados com o uso da matriz CHCA. Enquanto o espectro obtido com SA apresentou apenas 15 picos nesta faixa, o espectro obtido empregando a matriz CHCA obteve 25 picos. Em relação aos sinais acima de 8.000 m/z, ambos os espectros apresentaram nove picos com s:n>2.0, no entanto, os sinais acima de 8.000 m/z são mais bem resolvidos com a matriz SA. O estudo de (VARGHA *et al.*, 2006) também demonstrou uma maior quantidade de sinais com o uso da matriz CHCA em uma faixa menor de massa (1.800 a 8.000 m/z) quando comparado a matriz SA. Além disso, estes autores observaram uma melhor relação S:N para a matriz CHCA porém também relataram uma redução na resolução devido a um alargamento da base dos picos, quando comparado aos resultados da SA.

Embora a matriz SA tenha produzido bons espectros, apresentando um número considerável de sinais, os valores de log score obtidos foram sempre mais baixos que os resultados da CHCA. Além disso, observa-se que nenhum dos resultados obtidos com SA atingiu o limiar de confirmação da espécie ($\geq 2,0$) (Figura 22). Considerando que o espectro padrão desta espécie contido no banco de dados do fabricante foi obtido segundo o protocolo da Bruker que recomenda o uso da CHCA (MAIER; SCHWARZ; KOSTRZEWA, 2008; SEDO; SEDLACEK; ZDRAHAL, 2011), é compreensível que, com o uso da matriz de SA, menor coincidência de picos e intensidades de sinais tenha levado a um menor valor de Log Score. Em resumo, a matriz de SA se mostrou eficiente para ionizar as proteínas das amostras testadas, no entanto seria necessária uma maior investigação para assegurar que a diferenciação das espécies seria possível a partir do uso de uma biblioteca construída com espectros padrão utilizando a matriz SA.

Neste estudo, optou-se por usar a matriz de CHCA para as identificações, pois uma parcela das espécies de leveduras contidas na Coleção em estudo já possuem espectros-padrão inseridos no banco de dados do equipamento e construídos com a referida matriz. Além do mais, o uso da mesma matriz possibilita a comparação do banco de dados comercial com o banco de dados que será construído ao longo deste estudo.

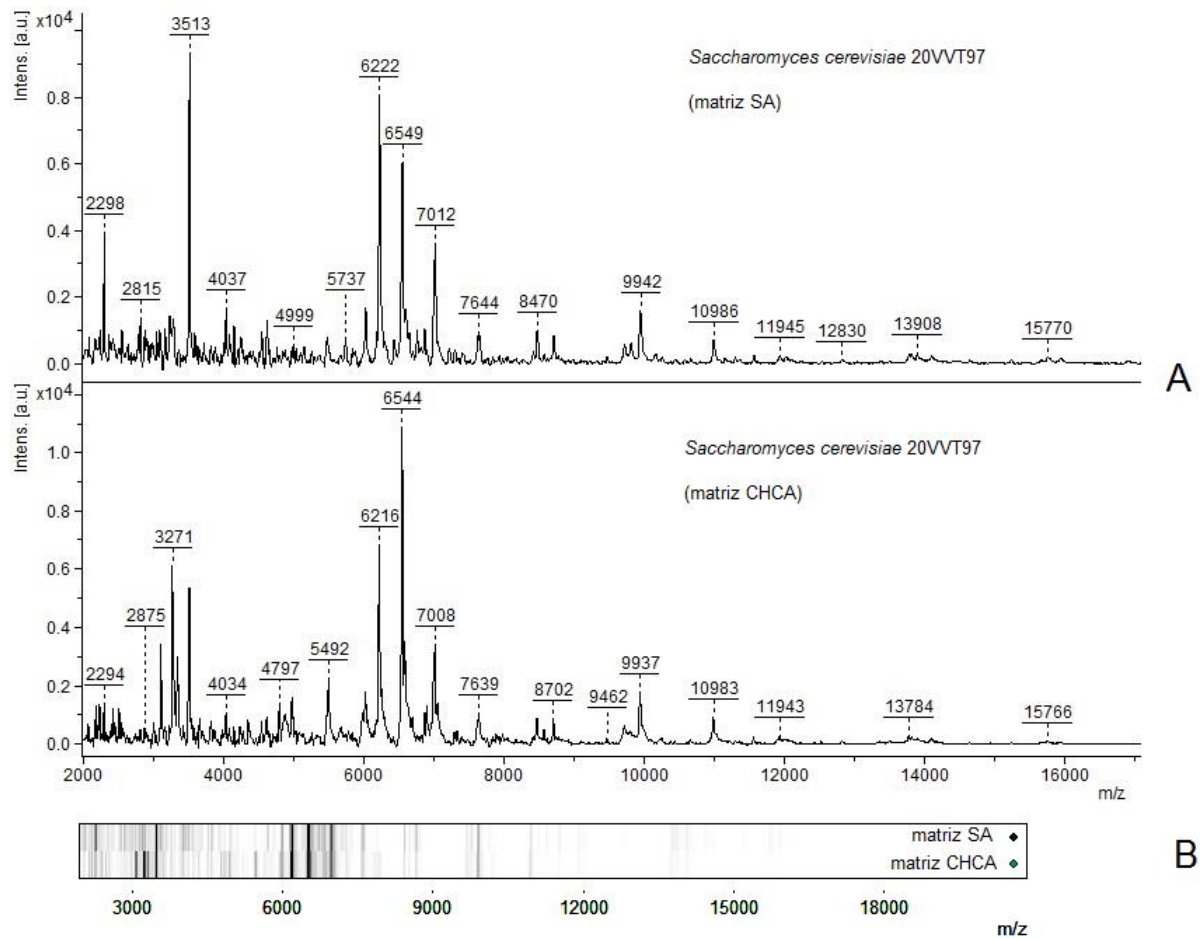


FIGURA 21 - (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE *Saccharomyces cerevisiae* 20VVT97 OBTIDOS COM DUAS MATRIZES DIFERENTES E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL

1º espectro – obtido do extrato celular sobreposto da matriz SA

2º espectro – obtido do extrato celular sobreposto da matriz CHCA

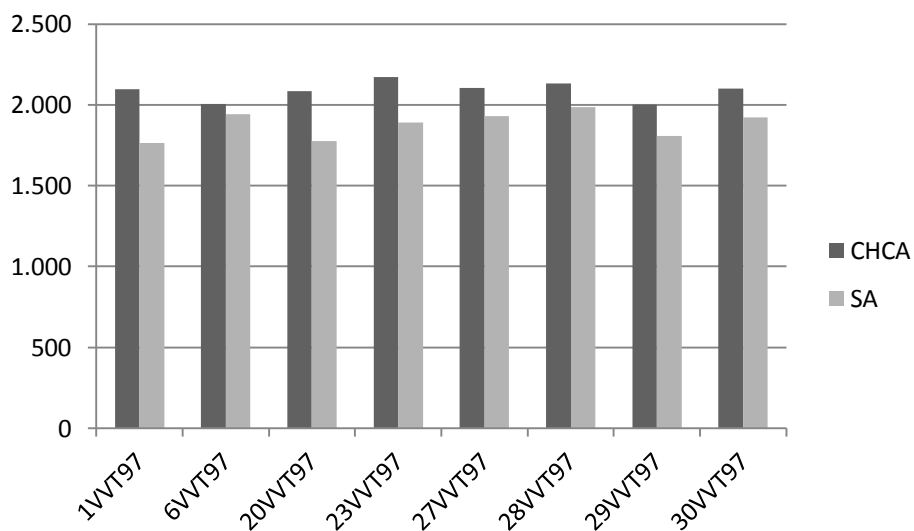


FIGURA 22 - VALORES DE LOG ESCORES PARA DIFERENTES LEVEDURAS DA ESPÉCIE *Saccharomyces cerevisiae* EMPREGANDO A MATRIZ CHCA E SA.

Outro fator investigado foi o método de deposição na placa-alvo. Muitas técnicas de deposição já foram descritas: (a) co-cristalização da matriz com a amostra (*dried-droplet*), na qual se faz uma mistura da amostra com a matriz e se deposita na placa como uma única camada (ARNOLD; REILLY, 1999); (b) formação de uma fina camada de matriz (*thin-layer method* ou *fast evaporation*), na qual a matriz solubilizada em um solvente de rápida evaporação (ex. acetona) é depositada primeiramente na placa, em seguida, a amostra é sobreposta (VORM; ROEPSTORFF; MANN, 1994); (c) método da dupla camada (*double-layer method*), o qual é uma junção do método (a) e (b) pois uma fina camada de matriz é depositada como no método sendo sobreposta de uma mistura de matriz com a amostra (VAIDYANATHAN *et al.*, 2002); (d) método da sobreposição, no qual se faz a deposição da amostra e, depois da evaporação do solvente, deposição da matriz em solução (RYZHOV; FENSELAU, 2001); (e) método do sanduíche (*sandwich method*), no qual a amostra é depositada entre duas camadas de matriz (KEYS *et al.*, 2004).

No presente estudo, foram avaliados três diferentes métodos: (1) co-cristalização da matriz com o extrato proteico (1:1); (2) deposição da matriz, seguida do extrato proteico; (3) deposição do extrato proteico e, depois da evaporação do solvente, deposição da matriz (Figura 23). Os resultados mostraram que a primeira técnica resultou em uma menor relação S/N e em um menor número de sinais m/z, principalmente na faixa de massa entre 2.000 e 5.000 m/z. O segundo método de deposição resultou em uma baixíssima ionização das moléculas conduzindo a uma baixa contagem de sinais e má qualidade espectral. Assim, o melhor resultado foi alcançado pelo último método. Outros autores também observaram que o melhor método para deposição é a sobreposição da matriz sob as células ou o extrato celular depois de evaporado o solvente. Este método tem sido o método de escolha por apresentar melhor homogeneidade do spot, reprodutibilidade e qualidade dos espectros (VAIDYANATHAN *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2007; SEDO; SEDLACEK; ZDRAHAL, 2011).

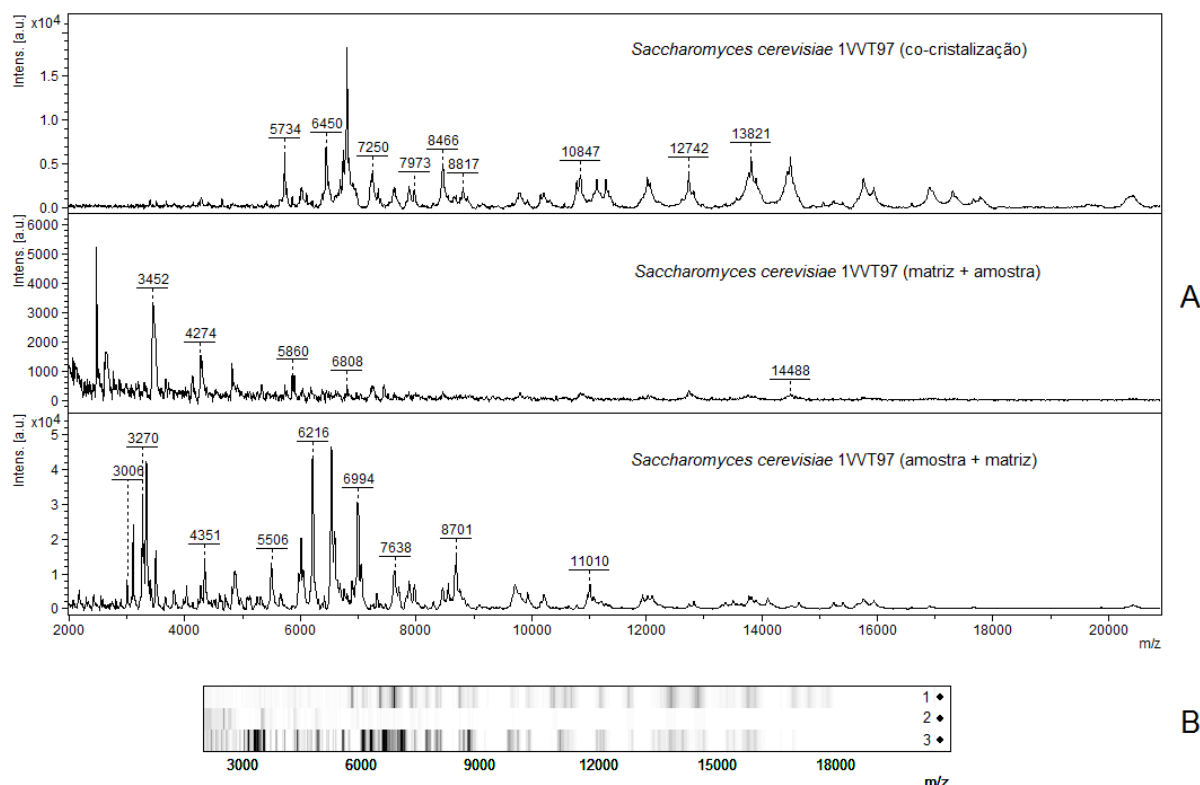


FIGURA 23 - (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 OBTIDOS COM DUAS MATRIZES DIFERENTES E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL

1º espectro – obtido da co-cristalização do extrato celular com a matriz (1:1)

2º espectro – obtido da deposição da matriz seguida da deposição do extrato

3º espectro – obtido da deposição do extrato seguido da deposição da matriz

5.2.5 Otimização da Metodologia quanto à Concentração da Amostra

Depois de escolhido o método de deposição da amostra, a influência da concentração das células no perfil espectral foi também avaliada. Este parâmetro já foi investigado por outros autores, os quais modificaram a concentração da matriz ou da amostra na tentativa de melhorar a qualidade espectral nos quesitos relação S:N e número de sinais detectados. Ao avaliar concentrações celulares de *Arthrobacter* entre 10^6 - 10^9 células/mL, VARGHA *et al.* (2006) demonstraram que abaixo de 10^7 células/mL nenhum sinal foi observado. Acima de $5 \cdot 10^8$ células/mL, os autores relataram uma diminuição na relação S:N quando do uso da matriz CHCA, já para a matriz SA concentrações até 10^9 células/mL apresentaram boa qualidade espectral. Outro estudo, empregou para a extração celular diferentes quantidades de *Bacillus anthracis* e *Yersinia pestis* variando entre 0,8 a 16 mg e concluiu que os melhores resultados foram obtidos com o uso de 4 mg (LIU *et al.*, 2007). Diferentemente dos

estudos acima, WILLIAMS *et al.* (2003) mantiveram a mesma concentração de uma suspensão de células (1.0 OD₆₁₀) de *Escherichia coli* ou *Listeria innocua* e modificaram a quantidade de matriz utilizada para co-cristalização (1:1, 1:3 ou 1:5; bactéria:matriz). Os autores não se detiveram a uma contagem real do número de células empregada para a análise e propuseram uma diluição seriada como uma alternativa rápida para encontrar a melhor diluição para cada amostra.

No presente estudo, empregou-se o cartão de Wickerham como técnica para a padronização da concentração de células, onde também não preconiza uma contagem real do número de células. Para avaliar a necessidade ou não de uma etapa de diluição foram avaliadas quatro espécies de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97, *Issatchenkia terricola* 26VVT97, *Starmerella bacillaris* 44VVT99 e *Sporidiobolus ruineniae* 11VSFCS10) quanto ao uso do extrato celular concentrado ou diluído na proporção 1:4 em água ultra-pura.

Para as três primeiras espécies descritas acima, tanto os espectros obtidos com 1 µL do sobrenadante diluído bem como com 1 µL do sobrenadante sem diluição, ambos sobrepostos por 1 µL da matriz, apresentaram-se muito semelhantes na maioria dos sinais m/z com apenas algumas pequenas diferenças no quesito intensidade de sinal. A Figura 24 apresenta os espectros da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97, sendo possível visualizar diferenças mínimas entre os sinais m/z obtidos para o extrato diluído quando comparado ao extrato sem diluição. Este comportamento da *Saccharomyces cerevisiae* demonstra que tanto o extrato puro quanto o diluído poderiam ser utilizados, sem prejuízo para o processo de identificação.

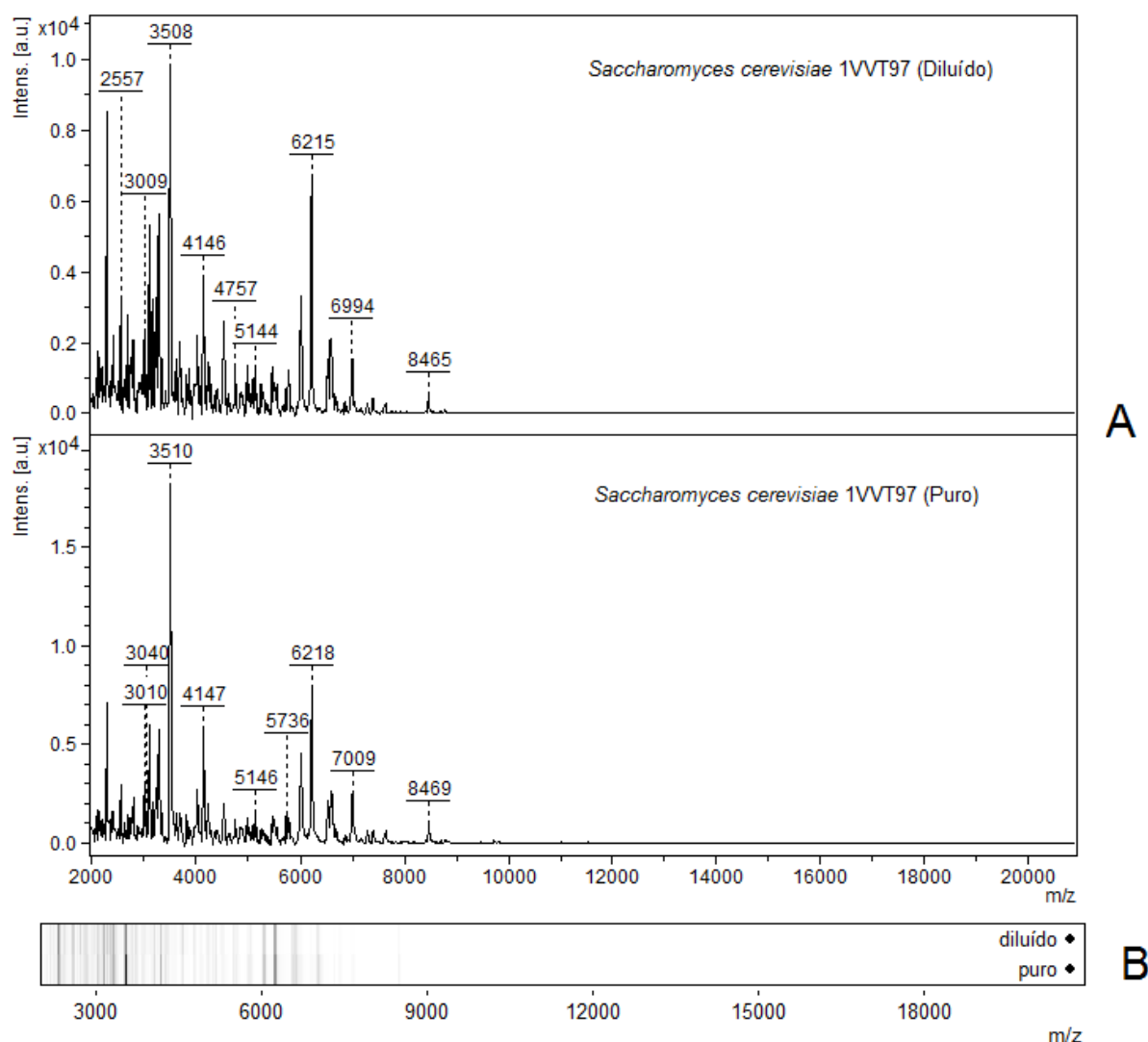


FIGURA 24- (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 COM E SEM DILUIÇÃO DO EXTRATO CELULAR E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL

1º espectro – extrato celular diluído na proporção 1:4;

2º espectro - extrato celular sem diluição.

No entanto, a linhagem *Sporidiobolus ruineniae* 11VSFCS10 (Figura 25) apresentou um comportamento diferente. O espectro originado do extrato puro, em virtude da concentração amostral, dificultou o desprendimento das moléculas, impedindo a ionização. Quando o extrato foi diluído, o espectro obtido apresentou uma grande quantidade de sinais m/z quando comparado com o anterior.

Considerando os resultados obtidos, a identificação das linhagens de leveduras foi efetuada priorizando apenas o uso da diluição 1:4 do extrato celular. No entanto, em virtude da grande diversidade de espécies e linhagens a serem analisadas, a extração celular não era descartada até a análise no espectrômetro de

massa MALDI-TOF, pois caso fosse necessário, uma nova diluição ou até mesmo o extrato concentrado poderia ser utilizado em uma nova análise.

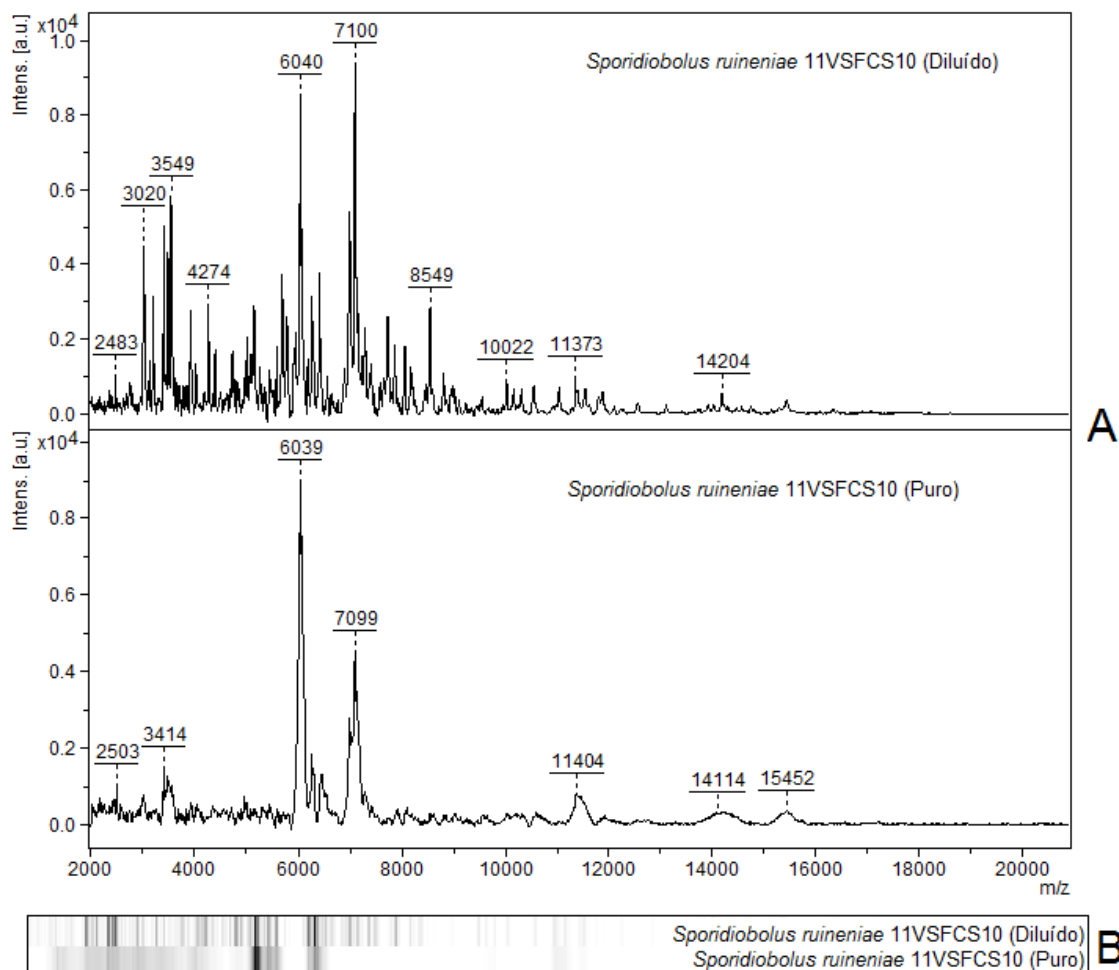


FIGURA 25 - (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE *Sporidiobolus ruineniae* 11VSFCS10 COM E SEM DILUIÇÃO DO EXTRATO CELULAR E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL

1º espectro – extrato celular diluído na proporção 1:4;

2º espectro - extrato celular sem diluição.

5.2.6 Análise da Precisão Instrumental e da Repetitividade das Análises

Análises de reprodutibilidade nas análises de identificação microbiana por MALDI-TOF MS são escassas e usam diferentes metodologias para esta avaliação. SAENZ *et al.* (1999) demonstraram a reprodutibilidade de espectros bacterianos pela verificação da presença e ausência de picos entre os espectros obtidos durante um período de três meses. Outros estudos exibiram uma análise robusta sobre a influência das condições de preparo da amostra (incluindo o solvente da amostra,

conteúdo em sais, composição da matriz, concentração celular) e do processo de extração para a obtenção de espectros reprodutíveis (WANG, Z. *et al.*, 1998; WILLIAMS *et al.*, 2003). Todos os estudos mencionados acima avaliaram a reprodutibilidade por meio de uma inspeção visual dos espectros, onde sinais m/z e intensidades eram comparados entre os espectros obtidos. Por outro lado, o estudo de SCHUMAKER; BORROR; SANDRIN (2012) reportou a influência da aquisição automática e manual dos espectros no que concerne à qualidade e à reprodutibilidade dos mesmos por meio de análises estatísticas dos dados coletados.

O termo reprodutibilidade não será utilizado para discutir os resultados do presente trabalho, pois sabe-se que o mesmo refere-se aos resultados obtidos de estudos de colaboração entre laboratórios, ou seja, quando uma mesma amostra é submetida à análise por diferentes laboratórios, alternando analista, local e equipamento (RIBANI *et al.*, 2004).

No presente estudo as análises foram avaliadas em relação à repetitividade e a precisão instrumental, usando as condições estabelecidas nos tópicos acima para o preparo da amostra. As intensidades absolutas bem como as intensidades relativas associadas aos quinze picos mais abundantes de duas leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (91B e 26B) foram utilizadas para calcular o coeficiente de variação (CV). O conceito de repetitividade (ou precisão intra-corrída) abrange realizar várias medições da mesma amostra, com diferentes preparações. De forma distinta, o conceito de precisão instrumental consiste em realizar medições sequenciais da mesma amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

De acordo com a Tabela 10 o CV médio referente ao parâmetro repetitividade utilizando as intensidades absolutas foi de 31,4%, enquanto o referente à precisão instrumental foi de 27,8%. No entanto, dependendo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* analisada estes coeficientes podem ser maiores ou menores do que a média, demonstrando mais uma vez a influência da linhagem da levedura na obtenção dos espectros. HETTICK *et al.* (2004) avaliaram seis espécies distintas de *Mycobacterium* e encontraram, para ensaios intracultura, coeficientes de variação médios para a intensidade dos picos variando entre 13,4 a 31,8%. Os referidos autores realizaram ainda ensaios interculturais e observaram que 83% da variação encontrada pode ser atrelada à variabilidade das abundâncias relativas observadas para cada sinal m/z , e a menor parcela da variação está associada à variação entre

as diferentes amostras e diferentes culturas empregadas. SAUER *et al.* (2008) também calcularam o CV médio em ensaios intra-corrida e inter-corrida obtendo 31,0 e 35% respectivamente.

Na tabela 10, ainda é possível verificar que a variação relacionada ao instrumento foi sempre menor quando comparada a variação associada ao método, tanto para os resultados empregando as intensidades absolutas quanto às intensidades relativas. Além disso, apesar do sobrenadante resultante da extração celular ter sido o mesmo usado para aplicar nos seis spots analisados para o cálculo da variação instrumental, a variabilidade inerente à deposição da amostra estava sempre presente. Por outro lado, a avaliação da repetitividade tem a adição de mais uma etapa passível de erro, uma vez que seis diferentes extrações foram conduzidas para compor os seis spots analisados.

TABELA 10 – COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA PRECISÃO INSTRUMENTAL E REPETIBILIDADE DAS ANÁLISES DO PERFIL MOLECULAR POR MALDI-TOF MS UTILIZANDO DUAS LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*

Linhagem	INTENSIDADES ABSOLUTAS		INTENSIDADES RELATIVAS	
	Repetitividade (CV %)	Precisão instrumental (CV %)	Repetitividade (CV%)	Precisão instrumental (CV%)
91B	38,4 ± 3,1	35,1 ± 1,5	22,6 ± 3,4	10,6 ± 1,4
26B	24,4 ± 1,8	20,5 ± 1,8	21,4 ± 2,0	11,3 ± 2,7
MÉDIAS	31,4 ± 2,4	27,8 ± 1,6	22,0 ± 2,7	10,9 ± 2,0

*Os CVs foram calculados a partir dos valores de intensidade dos 15 picos mais intensos. Os valores foram resultantes de sextuplicatas.

As análises de perfil molecular para identificação de microrganismos por MALDI-TOF MS estão fundamentadas nas intensidades relativas dos sinais m/z sem o uso de padrão interno. O programa Biotyper, que foi utilizado nas análises de identificação microbianas do presente estudo, trabalha com um algoritmo para fazer a comparação entre o espectro de massa obtido da amostra e os de referência contidos no seu banco de dados e, para isto, emprega além da coincidência dos sinais m/z, as intensidades relativas e a frequência dos mesmos (MELLMANN *et al.*, 2008; LARTIGUE *et al.*, 2009).

Sabendo que a intensidade relativa é um dos parâmetros avaliados para as análises de identificação, os estudos de repetitividade e precisão instrumental foram realizados também utilizando este parâmetro (Tabela 10). Assim, o coeficiente de variação encontrado para a repetitividade e para a precisão instrumental ficou em

22,0% e 10,9%, respectivamente. Confirmando então que a variação associada às intensidades relativas foi muito menor do que em relação à intensidade absoluta, permitindo uma comparação mais eficiente entre os espectros de referência e os espectros das amostras. E esta melhor eficiência se revela nos valores de log escore obtidos para as sextuplicatas, conforme apresentado na Tabela 11. Os valores são muito próximos uns dos outros, permitindo uma correta identificação em nível de espécie. Exceção se dá aos valores encontrados para a repetitividade da linhagem 91B que apresentou três valores de log escore abaixo do limite de 2,0, o qual garante, segundo o fabricante, a identificação em nível de espécie.

TABELA 11 - VALORES DE LOG ESCORES PARA AS SEXTUPLICATAS UTILIZADAS PARA O CÁLCULO DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO REFERENTE AO PARÂMETRO REPETIBILIDADE E PRECISÃO INSTRUMENTAL

LEVEDURA	Valores de Log Escore	
	REPETIBILIDADE	PRECISÃO INSTRUMENTAL
91B	2,176; 2,007; 2,015; 1,994; 1,997; 1,979	2,176; 2,292; 2,280; 2,296; 2,320; 2,299
26B	2,330; 2,334; 2,181; 2,215; 2,167; 2,355	2,330; 2,382; 2,373; 2,363; 2,273; 2,333

A baixa reprodutibilidade do MALDI-TOF MS é uma discussão longa e é frequentemente associada às variações inerentes a cada aplicação do laser (shot-to-shot variation) para a ionização das amostras. Esta variabilidade se deve ao pouco conhecimento sobre a cristalização da matriz e as etapas de dessorção/ionização (ALBRETHSEN, 2007; D'IMPERIO *et al.*, 2010). A distribuição não-uniforme dos cristais dentro de cada spot amostral (SAEZ *et al.*, 2011) bem como o desequilíbrio entre a quantidade ótima de matriz e analito (D'IMPERIO *et al.*, 2010) contribui com a disparidade detectada. Apesar destas dificuldades, em análises qualitativas, como é o caso das análises de comparação de perfis moleculares para a identificação de microrganismos, os algoritmos desenvolvidos para efetuar esta comparação entre os espectros amostrais e os de referência tem se mostrado robustos o suficiente para realizar a correta designação da amostra (SAUER *et al.*, 2008).

A revisão conduzida por ALBRETHSEN (2007) enumera as pesquisas com biomarcadores, empregando MALDI-TOF MS, para os diagnósticos clínicos. Nestas pesquisas, as análises quantitativas são muito úteis, tornando-se imprescindível obter uma boa reprodutibilidade nos ensaios para assegurar a exatidão dos resultados. O referido estudo apresenta um compilado de CVs da intensidade de

picos variando entre 2.3% até 40%. Para estudos quantitativos de biomarcadores e/ou biomoléculas, o uso de padrões internos tem sido apontado como alternativa para reduzir a variação referente às intensidades de picos (BUCKNALL; FUNG; DUNCAN, 2002; BUNGERT; HEINZLE; THOLEY, 2004). Porém o uso de um padrão interno nem sempre vai garantir a confiabilidade nos resultados, principalmente quando a amostra for uma mistura complexa (ALBALAT *et al.*, 2013). A supressão de sinais foi um dos motivos destacados pelos autores acima referidos para a ocorrência deste fenômeno. O uso de diluições sucessivas para encontrar a faixa linear de quantificação de cada analito é sugerido como alternativa para superar este problema.

5.2.7 Identificação Taxonômica das Leveduras Empregando o Banco de Dados do Fabricante

Ao avaliar as 871 linhagens de leveduras da Coleção analisada em relação ao potencial de identificação do MALDI-TOF MS apenas com o uso do banco de dados comercial Biotyper (versão 3.0), 65,2% delas foram identificadas considerando nível de espécie e gênero (Tabela 12). As espécies identificadas compreenderam *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia galeiformis*, *Pichia occidentalis* e *Pichia kudriavzevii*.

Pesquisas que englobaram isolados clínicos de leveduras apresentaram melhores porcentagens de identificação ao utilizar apenas o banco de dados Biotyper. JAMAL *et al.* (2014) obtiveram 92,6% de identificações corretas, MARKLEIN *et al.* (2009) apresentaram 92,5% e VAN VEEN; CLAAS; KUIJPER (2010) relataram 85,2% de sucesso nas identificações. No presente estudo, 34,6% de linhagens não identificadas (log escores <1,7) sugerem a ausência de um espectro de referência apropriado na biblioteca do fabricante. Sendo assim, esta baixa porcentagem de identificação reforça a presença predominante de espectros-padrão voltados à identificação de espécies de importância clínica em detrimento das espécies ambientais no banco de dados do equipamento.

TABELA 12 - RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA POR MALDI-TOF/MS USANDO PRIMEIRAMENTE O BANCO DE DADOS BIOTYPER E O BANCO DE DADOS SUPLEMENTAR.

Espécies identificadas por:	Nº de linhagens em seus respectivos log escores:			
	2,3 – 3,0	2,0 – 2,29	1,7 – 1,99	Total
Biblioteca Biotyper				
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	4	8	0	12
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	0	4	2	6
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	14	52	6	72
<i>Pichia galeiformis</i>	1	2	1	4
<i>Pichia kudriavzevii</i>	1	5	3	9
<i>Pichia membranifaciens*</i>	0	0	3	3
<i>Pichia occidentalis</i>	0	0	5	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	240	219	460
Total	21	311	236	568
Biblioteca Suplementar				
<i>Candida akabanensis</i>	0	4	2	6
<i>Candida apicola</i>	11	0	0	11
<i>Candida californica</i>	1	1	0	2
<i>Candida diversa</i>	28	3	0	31
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	20	32	11	63
<i>Issatchenkia hanoiensis</i>	2	0	0	2
<i>Issatchenkia terricola</i>	1	20	3	24
<i>Kwoniella heveanensis</i>	1	9	5	15
<i>Pichia kluyveri</i>	1	0	0	1
<i>Pichia myanmarensis</i>	110	10	2	122
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	1	0	0	1
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	11	5	2	18
<i>Starmerella bacillaris</i>	3	1	0	4
<i>Zygoascus meyeriae</i>	0	2	1	3
Total	190	87	26	303

*identificação errônea

O significado dos valores de log escores são: 2,3 – 3,0, identificação altamente provável da espécie; 2,0- 2,29, identificação segura do gênero, provável identificação da espécie; 1,7 – 1,99, provável identificação do gênero; 0,0-1,69, identificação não confiável.

As espécies designadas pela biblioteca do fabricante que obtiveram valores de log escores muito próximos ao limite de 1.7 foram confirmadas por biologia molecular usando a metodologia de ITS-RFLP. Esta abordagem apontou três linhagens como *Issatchenkia terricola* que foram identificadas como *Pichia membranifaciens* pela espectrometria de massas. Esta divergência foi resolvida com o uso de um terceiro método de identificação, no qual a região D1/D2 do 26S rDNA foi sequenciada e seu resultado foi favorável à técnica de ITS-RFLP, confirmando se tratar da espécie *Issatchenkia terricola*. A ausência do espectro-padrão adequado conduziu o banco de dados Biotyper a indicar a espécie *Pichia membranifaciens* como o espectro mais similar ao daquelas três linhagens.

A empresa Bruker Daltonics postula valores de log escores ≥ 2.0 para garantir a identificação da linhagem em nível de espécie. Entretanto, com exceção da espécie *Hanseniaspora uvarum*, todas as demais relatadas acima, apresentaram resultados de log escore < 2.0 . De acordo com STEVENSON *et al.* (2010), todos os microrganismos identificados em nível de espécie no seu estudo obtiveram valores de log escores ≥ 1.8 . Da mesma forma, PINTO *et al.* (2011) demonstraram que todos os resultados nos quais os log escores apontavam apenas para a confirmação do gênero do microrganismo, na verdade indicavam também a correta identificação daquelas linhagens.

Sendo assim, a técnica de ITS-RFLP foi utilizada para confirmar identificações com baixo valores de log score designadas pelo MALDI-TOF MS, para confirmação aleatória de algumas linhagens apenas para checar a confiabilidade dos resultados, bem como para identificar aquelas linhagens não identificadas por espectrometria de massa. No total, 175 linhagens (20,1 % da Coleção) foram submetidas à identificação por ITS-RFLP. Com exceção do erro causado pela ausência do espectro de *Issatchenkia terricola* (relatado anteriormente), todas as outras designações foram bem sucedidas em nível de espécie mesmo com alguns valores de log escores abaixo de 2.0.

5.2.8 Identificação Taxonômica das Leveduras empregando o Banco de Dados Suplementar

A espectrometria de massa MALDI-TOF tem demonstrado ser uma metodologia alternativa segura, rápida e de baixo custo analítico para a identificação de microrganismos. A identificação de espécies de leveduras ambientais pode representar um grande desafio quando as espécies-padrão não estão inclusas no banco de dados do equipamento, conduzindo a resultados errôneos ou a insucessos na identificação.

Algumas das espécies encontradas na Coleção analisada não faziam parte do banco de dados do fabricante. Desta maneira, para investigar a capacidade da espectrometria de massa MALDI-TOF em diferenciar estas espécies foi necessário criar um Banco de Dados Suplementar para adicionar os novos espectros e assim servir como padrão. Foram adicionadas ao novo banco de dados um total de 14

espécies de leveduras sendo elas: *Hanseniaspora opuntiae*, *Issatchenkia terricola*, *Issatchenkia hanoiensis*, *Candida diversa*, *Starmerella bacillaris*, *Candida apicola*, *Kwoniella heveanensis*, *Pichia myanmarensis*, *Zygoascus meyeriae*, *Sporidiobolus ruineniae*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Candida californica*, *Candida akabanensis* e *Pichia kluyveri*.

Cada espectro de referência gerado representa o padrão individual de picos, incluindo a intensidade relativa e a frequência dos picos de um dado microrganismo (MOOTHOO-PADAYACHIE *et al.*, 2013). Depois da construção desta Biblioteca inicial, todas as linhagens analisadas foram corretamente identificadas comprovando a eficácia das novas entradas no banco de dados. As três linhagens, primeiramente identificadas como *Pichia membranifaciens* pela biblioteca do fabricante (item 5.2.6), após a criação dos espectros-padrão adicionais foram corretamente designadas como *Issatchenkia terricola*. Identificações errôneas causadas pelo uso de banco de dados incompletos para a identificação de leveduras já foram demonstradas por outros estudos (MARKLEIN *et al.*, 2009; VAN VEEN; CLAAS; KUIJPER, 2010).

Conforme descrito nas identificações por biologia molecular, as espécies *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora opuntiae* não puderam ser corretamente designadas com a técnica de PCR-RFLP empregando apenas as enzimas *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*. Foi preciso aliar outras duas enzimas para a discriminação (*DdeI* e *MboI*). Contudo, a espectrometria de massa MALDI-TOF foi eficiente em fazer esta discriminação, como pode ser observado claramente pelas diferenças visuais entre os espectros de ambas as espécies na Figura 26.

As linhagens de *Candida diversa* também não puderam ser identificadas por biologia molecular. Entretanto neste caso, o problema apresentado foi a não amplificação da região ITS1-ITS2 por falha na hibridização do iniciador ITS1. No entanto, a espectrometria de massa MALDI-TOF conseguiu efetuar a identificação desta espécie discriminando-a das demais pelo seu perfil molecular.

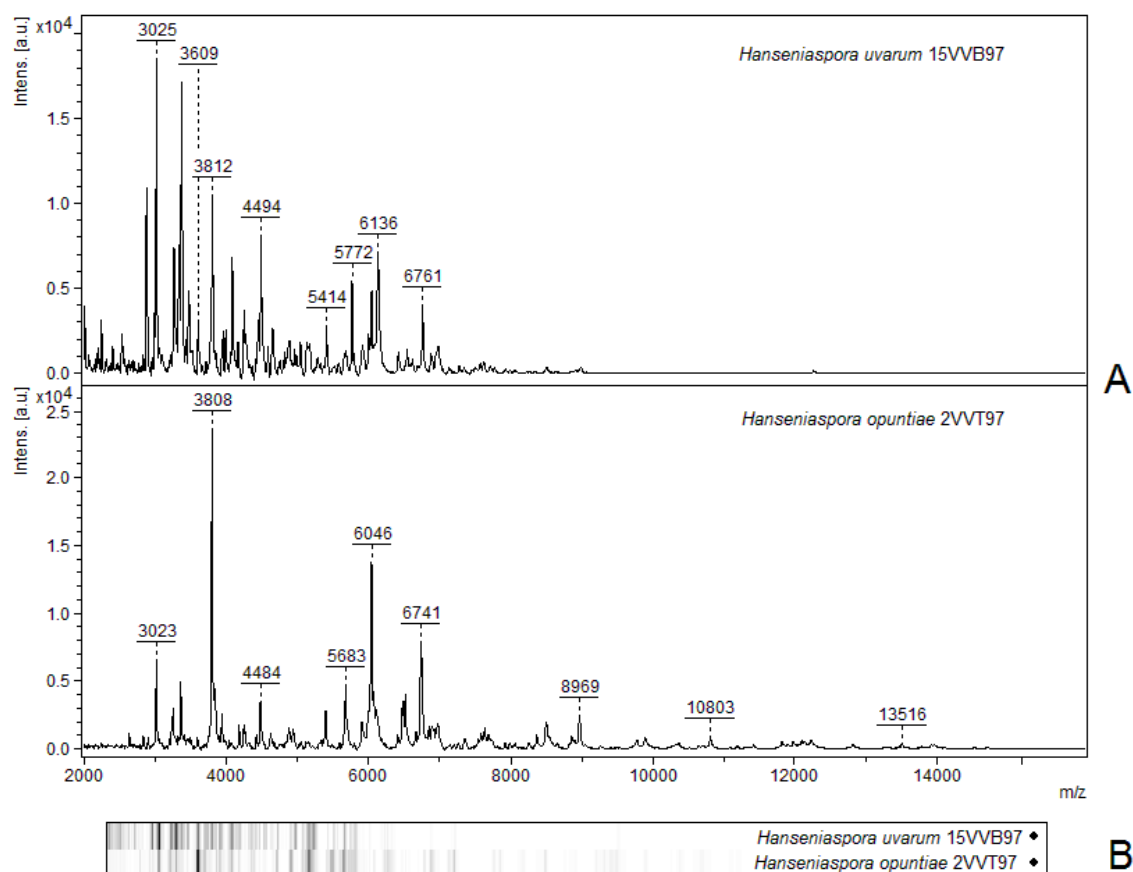


FIGURA 26 - (A) ESPECTROS DE MASSA DA ESPÉCIE *Hanseniaspora uvarum* 15VVB97 E *Hanseniaspora opuntiae* 2VVT97 E (B) SEUS SINAIS ESPECTRAIS NO FORMATO DE SEPARAÇÃO EM GEL.

Os exemplos apresentados acima reforçam as vantagens do uso do MALDI-TOF MS para a identificação taxonômica uma vez que, depois da adição de espectros de referência ausentes no banco de dados, esta técnica identificou corretamente todas as linhagens que não obtiveram êxito quanto à identificação por técnicas de biologia molecular, além de apresentar um baixo custo analítico e um mínimo tempo de preparo amostral.

Comparando os resultados apresentados na Tabela 12, é notável que o Banco de Dados Suplementar favoreceu a obtenção de valores de log escores maiores que 2.3, o que significa identificação altamente provável da espécie. Esta afirmação demonstra as similaridades entre as leveduras de uma mesma espécie isoladas da superfície de bagas de uva. CHRISTENSEN *et al.* (2012) também relataram o aumento nos valores de log escores depois de aumentar o banco de dados, pois a grande maioria das leveduras testadas atingiram valores entre 2.3 e 3.0. LAU *et al.* (2013) desenvolveram uma extensa biblioteca para a identificação de fungos filamentosos e notaram que o limite estabelecido pelo fabricante para a

confirmação da espécie (≥ 2.0) poderia ser mantido para as identificações. Os resultados do presente estudo corroboram com esta afirmação visto que 91,4% das identificações usando a biblioteca suplementar alcançaram valores de log score ≥ 2.0 , contra apenas 58,4% usando a biblioteca do fabricante.

Nos últimos meses da finalização do presente estudo, o Banco de Dados Biotyper foi atualizado para a versão 3.1, passando de 3.995 espectros de referência, com 315 deles dentro da classe dos fungos, para 5.627 espectros de referência sendo 649 deles de fungos. Do interesse deste estudo, foram acrescentados três espécies anteriormente ausentes e que já haviam sido inseridas no Banco de Dados Suplementar, sendo elas *Hanseniaspora opuntiae*, *Issatchenkia terricola* e *Pichia kluyveri*. Como estas espécies já haviam sido inseridas previamente, não houve alterações nas identificações das linhagens da Coleção, com exceção da *Candida akabanensis*. Com a atualização do banco de dados, foi incluído ao programa Biotyper um espectro de referência da espécie de levedura *Candida blattae*. Esta espécie apresentou um valor de log score sempre abaixo, mas muito próximo ao da *Candida akabanensis*, inserida no Banco de Dados Suplementar, para todas as seis linhagens de *Candida akabanensis* existentes na Coleção. A linhagem 33VVT99 obteve 99% de similaridade com a espécie *Candida akabanensis* e apenas 93% de similaridade com a espécie *Candida blattae*. No entanto, ao fazer uma revisão da literatura sobre estas duas espécies, uma proximidade muito grande em análises filogenéticas da região D1/D2 entre estas duas espécies é observada (RIBEIRO *et al.*, 2011). O perfil molecular das duas espécies (Figura 27) apesar de apresentarem muitos picos em comum, apresentam também muitos picos que são marcadores da espécie.

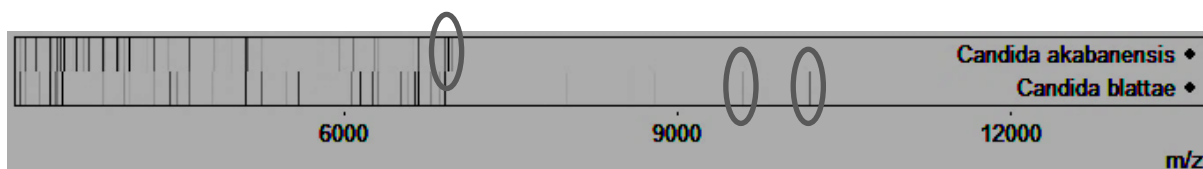


FIGURA 27 – COMPARAÇÃO DOS SINAIS ESPECTRAIS OBTIDOS PARA OS ESPECTROS DE REFERÊNCIA DAS ESPÉCIES *Candida akabanensis* E *Candida blattae*

*Os sinais m/z que são potenciais marcadores específicos estão circulados em ambas as espécies.

Os picos potenciais marcadores da *Candida blattae* são m/z 9582 e 10184, com intensidades relativas de 10 e 16%, respectivamente. Já para a *Candida*

akabanensis um potencial marcador seria m/z 6927, com intensidade relativa de 50%. Estes picos marcadores foram escolhidos por serem específicos destas espécies, isto é, eles não aparecem nos espectros de nenhuma outra espécie contida na Coleção. Para as seis linhagens da Coleção estudada o pico marcador da *Candida akabanensis* foi verificado (Figura 28), enquanto nenhum dos marcadores da *Candida blattae* foi encontrado.

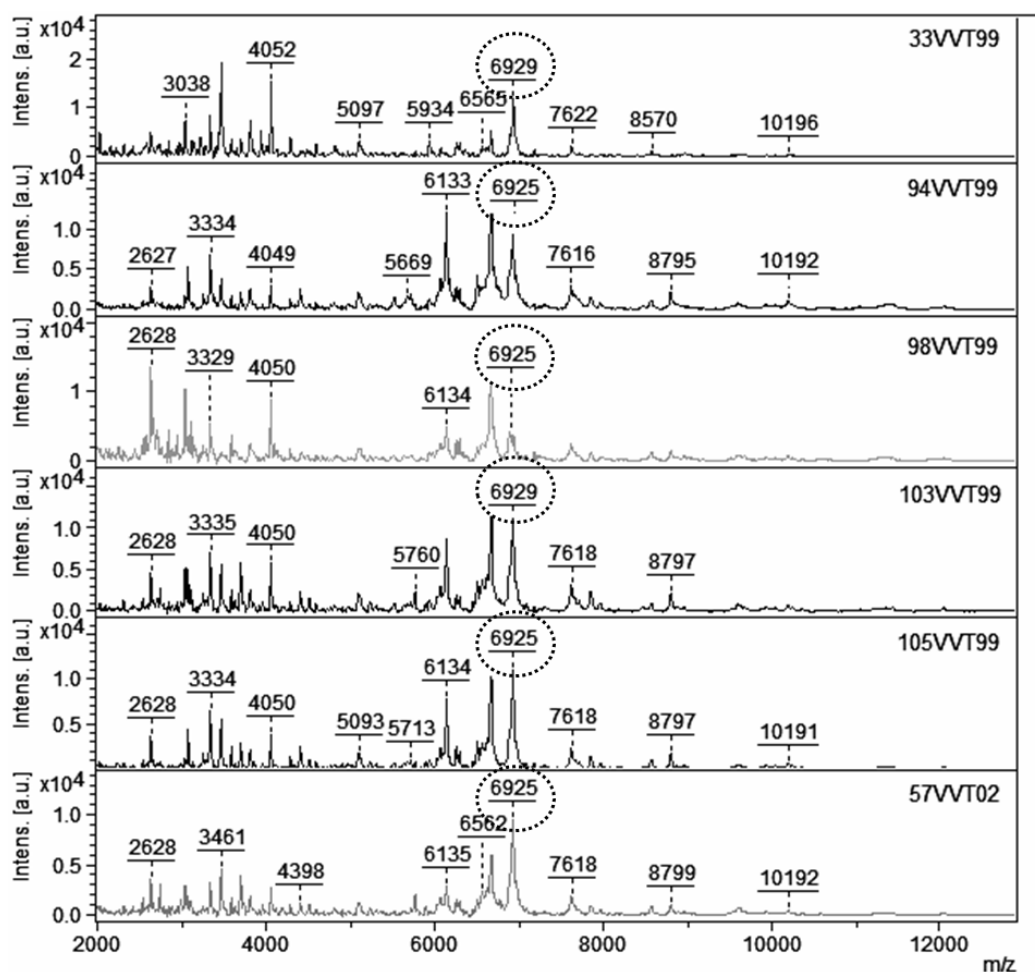


FIGURA 28 – LINHAGENS DA ESPÉCIE *Candida akabanensis* PRESENTES NA COLEÇÃO DEMONSTRANDO A PRESENÇA DO PICO MARCADOR m/z 6927

A aplicação de análises multivariadas como a análise de componentes principais (PCA), reduz a dimensionalidade dos dados para um menor número de componentes para descobrir e interpretar as propriedades das amostras, permitindo o agrupamento das mesmas. O conjunto de dado foi analisado através do pré-processamento autoescalado e o resultado obtido foi capaz de diferenciar as espécies presentes exclusivamente no banco de dados suplementar (Figura 29).

Cada espécie foi analisada perante dez espectros coletados por MALDI-TOF MS, onde cada um deles é representado por um ponto no gráfico. Os pontos referentes a cada espécie são precisos, mas não apresentam uma exatidão grande, demonstrando que a diferenciação das espécies é possível, porém existem pequenas variações dentro de cada uma das coletas espectrais. Assim, a análise de componentes principais pode também ser utilizada como uma ferramenta para checar a repetitividade entre as replicatas de uma amostra. E neste caso, esta análise confirma, de forma visual, que cada espécie realmente possui um grupo de sinais m/z específicos a tal ponto que a distancia das demais espécies. Este conjunto específico de sinais é o que a literatura tem chamado de impressão digital (*fingerprinting*) do microrganismo. QIAN *et al.* (2008) usaram uma abordagem similar empregando apenas a presença de picos diagnósticos, excluindo a variação da intensidade dos picos, para efetivamente agrupar os perfis proteicos da mesma linhagem de levedura submetida a condições minimamente diferentes.

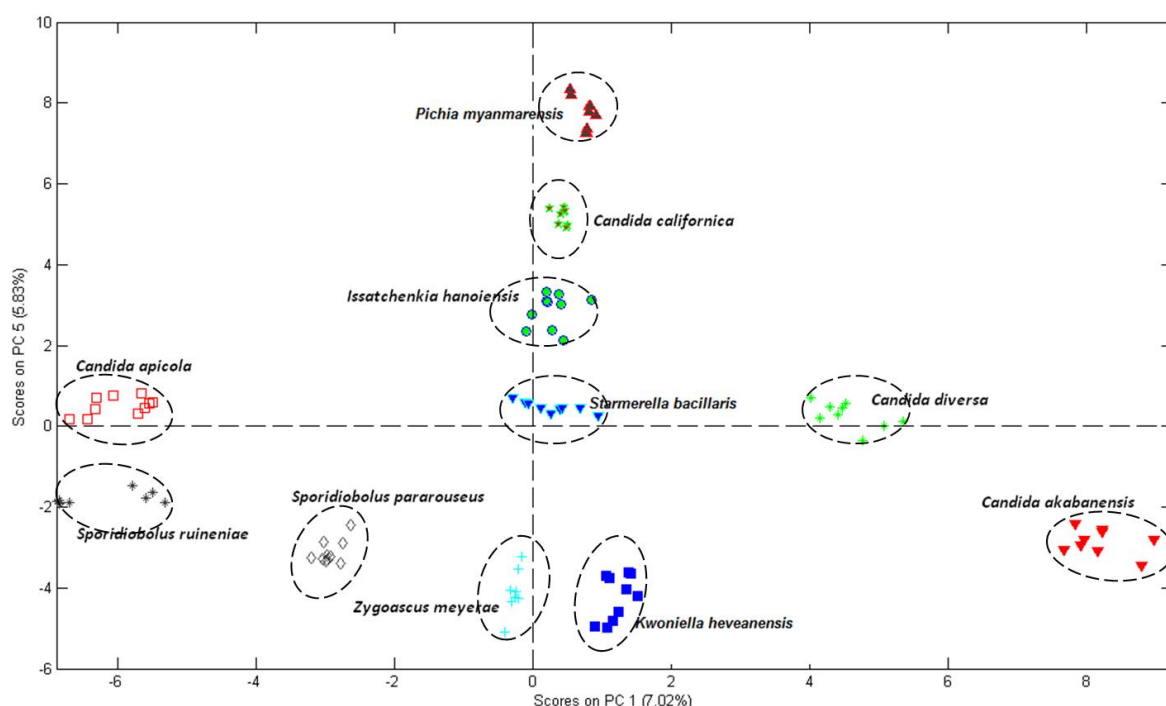


FIGURA 29 – DIFERENCIAÇÃO EFETIVA DAS ESPÉCIES INSERIDAS NA BIBLIOTECA SUPLEMENTAR UTILIZANDO ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.

5.2.8.1 Avaliação da adição de um espectro padrão de uma linhagem única de *Saccharomyces cerevisiae* presente na Coleção ao Banco de Dados Suplementar

Ao analisar atentamente a Tabela 12, verifica-se que aproximadamente 50% das linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae* analisadas apresentaram valores de log escores confirmando apenas o gênero (>1.7 e <2.0) da espécie. As possíveis explicações para estes baixos valores de log escores incluem uma extração proteica insuficiente para estas amostras e uma grande variabilidade na expressão molecular dentro desta espécie.

A habilidade do MALDI-TOF MS em prover identificações corretas depende do número de entradas por espécie no Banco de Dados do Fabricante. À medida que o número de entradas para a mesma espécie aumenta, melhor será a representatividade da diversidade intra-espécie devido a possíveis variações na expressão proteica entre as linhagens (PINTO *et al.*, 2011). Os estudos de STEVENSON *et al.* (2010) e DHIMAN *et al.* (2011) também relataram dificuldades similares na obtenção de valores de log escores ≥ 2.0 para espécies de microrganismos do gênero *Aureobasidium*, *Candida* e *Cryptococcus*, apesar da existência de espectros de referência na biblioteca utilizada. Para estes autores, casos como estes ocorrem devido a propriedades inerentes às linhagens em análise ou, como já mencionado, devido a um número insuficiente de entradas para permitir uma análise comparativa robusta entre o espectro-padrão e o da amostra desconhecida.

Considerando a última hipótese, fez-se a adição de um espectro padrão para a *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 ao Banco de Dados Suplementar como a representante das leveduras vínicas existentes na Coleção analisada. Após esta inclusão todos os espectros coletados anteriormente, referente à espécie *Saccharomyces cerevisiae*, foram repassados frente ao novo banco de dados. A inclusão apenas desta levedura, fez com que 80% das linhagens fossem agora realocadas para valores de log escore maiores que 2.0 (Tabela 13). Com isto confirma-se que a inclusão de espectros de diferentes linhagens ao banco de dados auxilia na obtenção de maiores porcentagens de identificação.

TABELA 13 - RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* APÓS INCLUSÃO DO ESPECTRO DE REFERÊNCIA DA LINHAGEM VÍNICA *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 AO BANCO DE DADOS SUPLEMENTAR

Espécies identificadas por:	Nº de linhagens em seus respectivos log escores:		
	2,3 – 3,0	2,0 – 2,29	1,7 – 1,99
Biotyper			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	241	219
Biotyper + Suplementar			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	241	92
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1vvt97	37	90	0
TOTAL	38	331	92

Este resultado aponta para a provável capacidade do MALDI-TOF MS em discernir microrganismos em nível de sub-espécie. MOOTHOO-PADAYACHIE *et al.* (2013), por sua vez, já demonstraram sucesso na diferenciação de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*.

5.2.9 Análise de Todas as Espécies Contempladas na Coleção

Empregando os MSP das 21 espécies de leveduras encontradas na Coleção, as mesmas foram agrupadas hierarquicamente (Figura 30). As espécies com um nível de distância maior que 700 apresentaram um padrão de sinais *m/z* completamente diferentes. Apesar das espécies que apresentaram distâncias menores que 700 demonstrarem semelhanças no perfil espectral, todas elas foram classificadas em nível de espécie sem prejuízo para a identificação.

No presente estudo, pode ser assumido que a menor distância alcançada para a diferenciação das espécies analisadas foi de 300 como pode ser visto para *Issatchenkia hanoiensis* e *Issatchenkia terricola*. O estudo de CALDERARO *et al.* (2014b) demonstrou a incapacidade do MALDI-TOF MS em distinguir as espécies de dermatófitos *Trichophyton interdigitale* e *Trichophyton mentagrophytes*. No dendrograma apresentado pelos referidos autores estas espécies foram posicionadas no mesmo agrupamento, com distância euclidiana menor que 100. Entretanto, o potencial do MALDI-TOF MS para diferenciar microrganismos já alcançou distâncias menores que 100 no que diz respeito à diferenciação de

linhagens (SEDO; SEDLACEK; ZDRAHAL, 2011; CHRISTENSEN *et al.*, 2012; MOOTHOO-PADAYACHIE *et al.*, 2013; CALDERARO *et al.*, 2014a).

É importante ressaltar que o dendrograma gerado a partir dos espectros de massas não representa as relações filogenéticas entre as espécies. O espectro originado das análises de MALDI-TOF MS representa não apenas as proteínas ribossomais, mas também outras proteínas e moléculas abundantes expressas pela célula e que usualmente não refletem a distância evolucionária (UHLIK *et al.*, 2011).

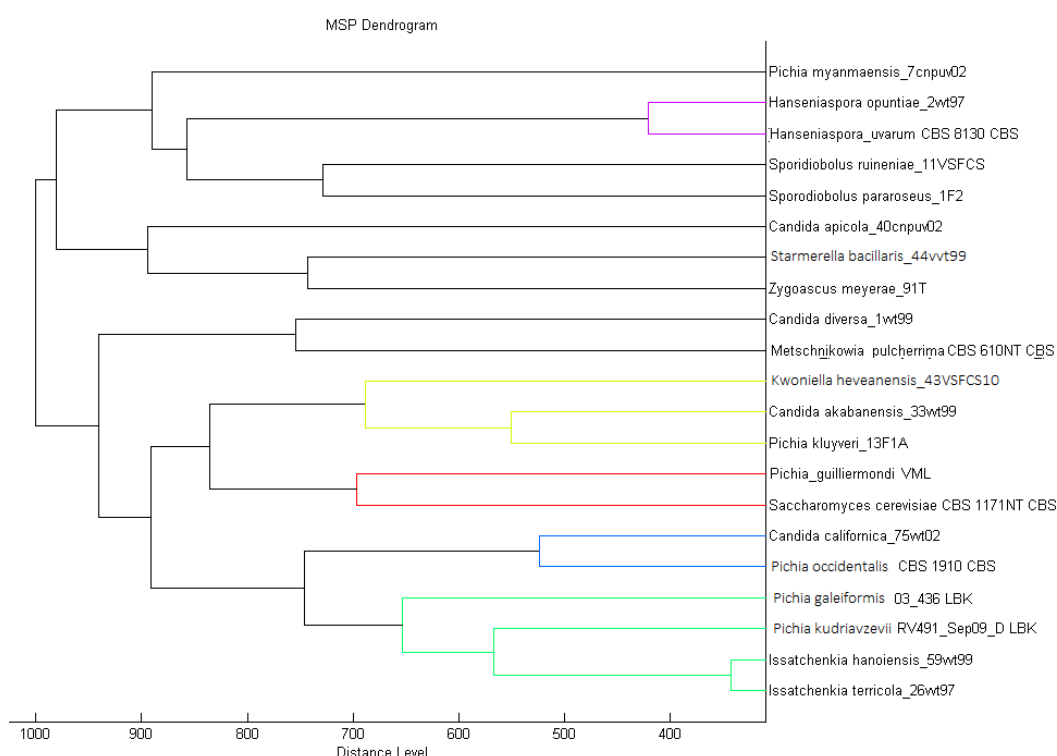


FIGURA 30 - DENDROGRAMA COM AS 21 ESPÉCIES DE LEVEDURAS PRESENTE NA COLEÇÃO

Segundo o dendrograma acima, as espécies que mais apresentam semelhanças são a *Issatchenkia hanoiensis* e a *Issatchenkia terricola*. Mas quando visualizamos os sinais que deram origem aos espectros-padrão das mesmas (Figura 31) visualiza-se um padrão de bandas suficientemente diferentes para garantir uma perfeita distinção pelo perfil molecular obtido pela espectrometria de massa MALDI-TOF. Ainda nesta figura, nota-se que a grande maioria das espécies estudadas apresenta um padrão de sinais concentrado entre 3.000 e 9.000 m/z, sendo elas as espécies *Meyerozyma guilliermondii*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Kwonilella heveanensis*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia occidentalis*, *Pichia kluyveri*, *Issatchenkia hanoiensis*; *Candida californica*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Candida akabanensis*.

As espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida diversa*, não entram neste grupo pela presença de uma única banda acima de 9.000 m/z. As demais espécies apresentam sinais também mais concentrados na faixa de 3.000 a 9.000 m/z, mas com outros vários presentes em uma faixa m/z maior que 9.000 (Figura 31).

Na Figura 31 é ainda possível verificar a importância de haver mais de uma entrada para uma mesma espécie no banco de dados utilizado para identificação, pois as duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas apresentam um padrão de sinais com alguns picos em comum, mas uma grande parcela deles sendo característicos para uma das linhagens apenas. Assim, torna-se mais compreensível o motivo pelo qual depois que a linhagem 1VVT97 foi adicionada ao Banco de Dados Suplementar, reduziu-se de 50% para 20% o número de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da Coleção que saíram da faixa de log score de 1.7-2.0 para a faixa de >2.0 (Tabela 11).

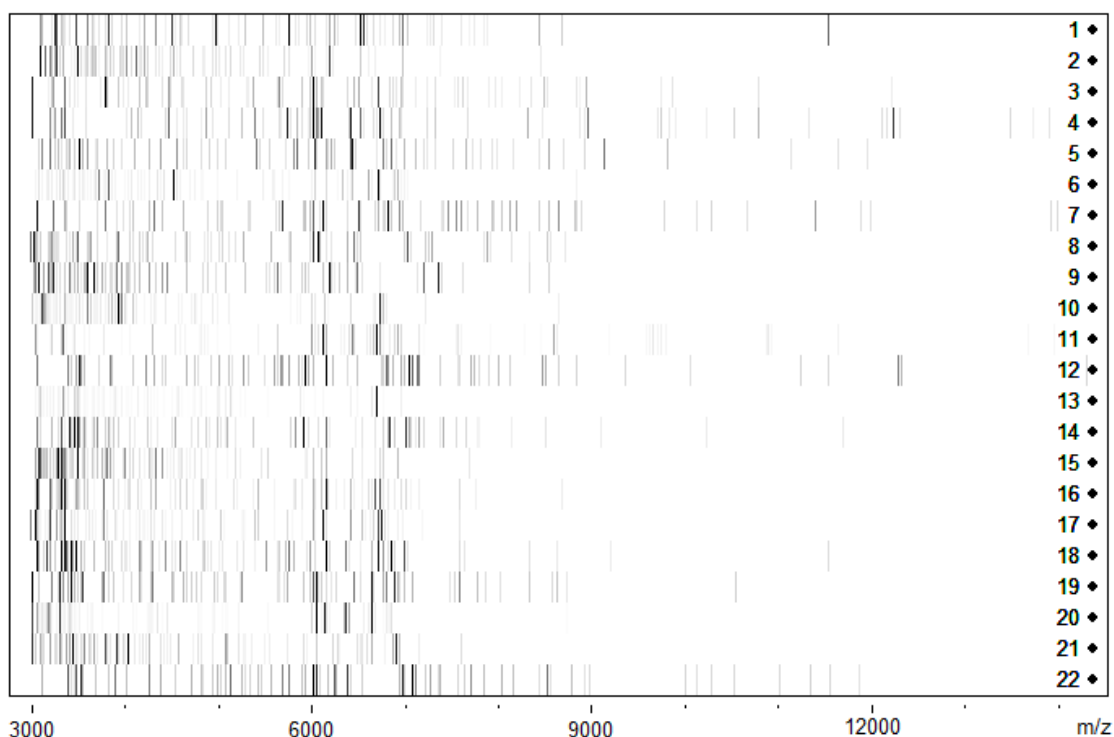


FIGURA 31 – REPRESENTAÇÃO EM FORMA DE SEPARAÇÃO EM GEL DOS ESPECTROS-PADRÃO DE TODAS AS ESPÉCIES CONTIDAS NA COLEÇÃO ANALISADA

Espécie por linha:

1 – *Saccharomyces cerevisiae*; 2 – *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97; 3 – *Hanseniaspora opuntiae*; 4 – *Hanseniaspora uvarum*; 5 – *Zygoascus meyeri*; 6 – *Meyerozyma guilliermondii*; 7 – *Pichia myanmarensis*; 8 – *Sporidiobolus pararoseus*; 9 – *Kwoniella heveanensis*; 10 – *Pichia kudriavzevii*; 11 – *Pichia galeiformis*; 12 – *Candida apicola*; 13 – *Pichia occidentalis*; 14 – *Starmerella bacillaris*; 15 – *Pichia kluyveri*; 16 – *Issatchenkia hanoiensis*; 17 – *Candida californica*; 18 – *Issatchenkia terricola*; 19 – *Candida diversa*; 20 – *Metschnikowia pulcherrima*; 21 – *Candida akabananensis*; 22 – *Sporidiobolus ruineniae*

5.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS LEVEDURAS DA COLEÇÃO

As análises das características morfológicas microscópicas corroboram com a identificação dos microrganismos. No entanto, fica ainda mais evidente a dificuldade de se distinguir algumas espécies de leveduras. Isto reforça a importância das técnicas de biologia molecular e de espectrometria de massa MALDI-TOF para a identificação microbiana.

Em razão da mudança recente para a nomenclatura única dos fungos e, ainda, do impasse existente em relação à nova lista de nomes aceitos, neste item será apresentado tanto o nome da forma teleomórfica quanto da anamórfica, quando existir.

5.3.1 Gênero *Candida*

Este gênero é pertencente ao grupo das leveduras imperfeitas. As células deste gênero podem se apresentar globosas, cilíndricas ou alongadas, raramente apiculadas, ogival e triangular. Reproduzem-se usualmente por brotamento multilateral. Podem formar pseudomicélio rudimentar ou bem desenvolvido; algumas espécies podem exibir micélio verdadeiro. Podem produzir clamidósporos, que são esporos assexuados de parede grossa que conseguem sobreviver em condições adversas. Apresentam espécies pertencentes ao grupo dos ascomicetos bem como dos basidiomicetos (KREGER-VAN RIJ, 1984).

As espécies deste gênero encontradas na Coleção foram: *Candida akabanensis*, *Candida apicola*, *Candida californica* e *Candida diversa*. As duas primeiras apresentam células ovais ou esféricas. As células de *Candida californica* se apresentam ovais ou alongadas, enquanto as de *Candida diversa* são apenas ovais. Todas estas espécies se reproduzem por brotamento multipolar e podem aparecer isoladas, em pares ou em pequenas cadeias (Figura 32).

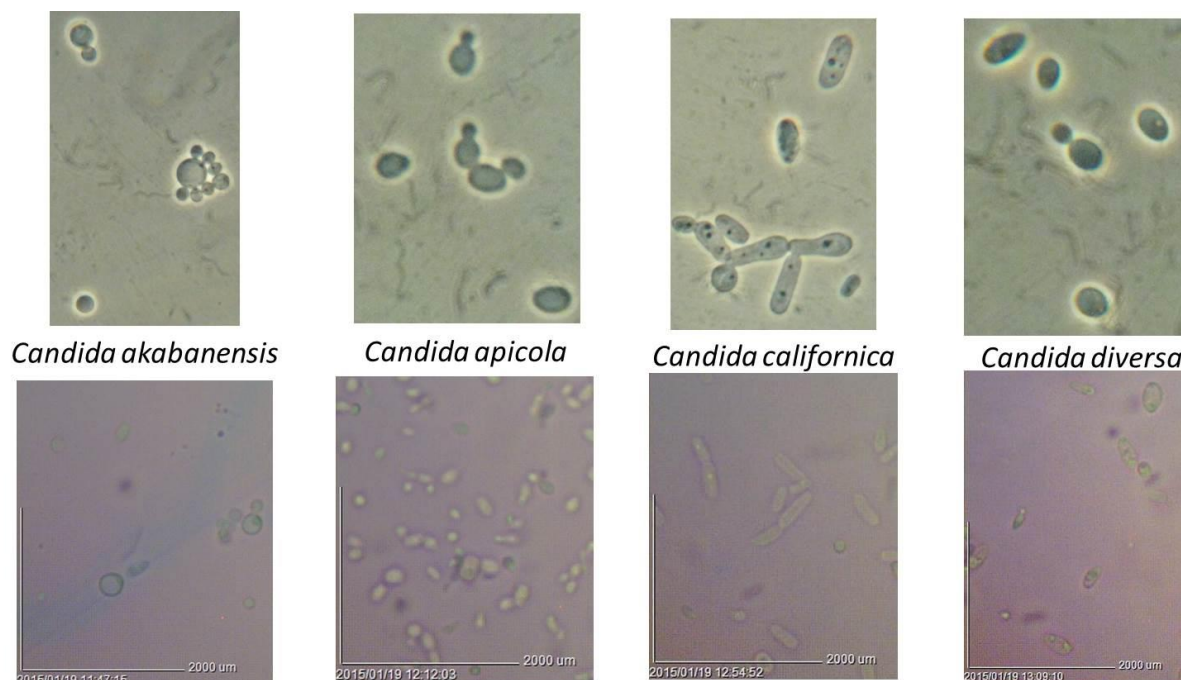


FIGURA 32 – MICROSCOPIA DAS ESPÉCIES *Candida akabanensis*, *Candida apicola*, *Candida californica* E *Candida diversa*

As imagens superiores foram obtidas usando contraste de fase e com um aumento de 2.000x. As imagens inferiores foram obtidas usando campo claro e com um aumento de 400x

5.3.2 Gênero *Hanseniaspora*

Pertencem ao grupo dos ascomicetos. As células são apiculadas (formato de limão), ovais ou alongadas. A reprodução é por brotamento bipolar. Por vezes, pode-se observar a formação de pseudomicélio bem formado ou apenas rudimentar. Os ascósporos formados neste gênero podem ser encontrados no formato de chapéu ou de capacete, e são encontrados em número de dois a quatro dentro do asco. Podem ainda apresentar ascósporos no formato esférico com uma saliência equatorial, mas estes não são liberados do asco (KREGER-VAN RIJ, 1984).

As espécies deste gênero encontrada na Coleção foram *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) e *Hanseniaspora opuntiae*. As células de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora opuntiae* se apresentam no formato oval ou formato de limão (apiculado), como pode ser observado na Figura 33. Ambas se multiplicam por brotamento polar.

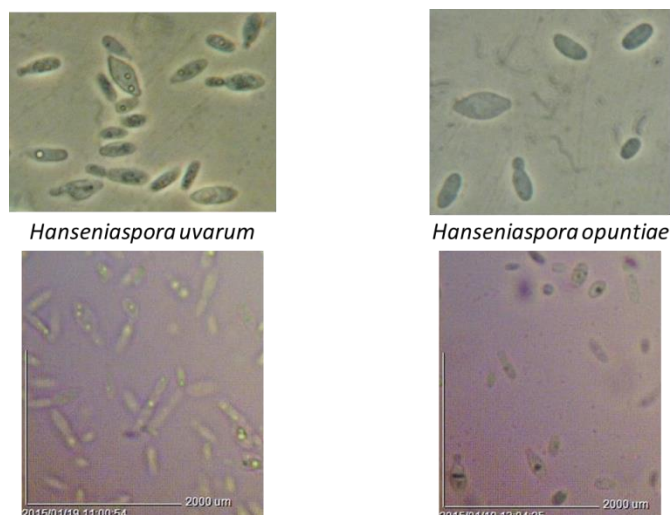


FIGURA 33 – MICROSCOPIA DAS ESPÉCIES *Hanseniaspora uvarum* E *Hanseniaspora opuntiae*

As imagens superiores foram obtidas usando contraste de fase e com um aumento de 2.000x. As imagens inferiores foram obtidas usando campo claro e com um aumento de 400x

5.3.3 Gênero *Issatchenkia*

São leveduras pertencentes ao grupo dos ascomicetos. As células são esféricas, elipsoides ou alongadas. A reprodução se dá por brotamento multilateral. Podem apresentar pseudomicélio. Os ascos são persistentes e podem formar de um a quatro ascospóros esféricos com aparência rugosa (KREGER-VAN RIJ, 1984).

As espécies deste gênero encontradas na Coleção foram *Issatchenkia hanoiensis* e *Issatchenkia terricola*. Suas células são ovóides ou alongadas. Exibem brotamento multipolar. Podem aparecer isoladas ou em pares (Figura 34).



FIGURA 34 – MICROSCOPIA DAS ESPÉCIES *Issatchenkia hanoiensis* E *Issatchenkia terricola*.

As imagens superiores foram obtidas usando contraste de fase e com um aumento de 2.000x. As imagens inferiores foram obtidas usando campo claro e com um aumento de 400x

5.3.4 Gênero *Kwoniella*

Pertencem ao grupo dos basidiomicetos. As células são ovoides, elipsoides ou globosas. Apresentam-se isolados ou em pequenas cadeias. A reprodução por brotamento com um ou dois brotos apenas. Podem apresentar pseudomicélio rudimentar e, raramente, micélio verdadeiro. Os basídios apresentam variações morfológicas podendo ser globosos, ovoides com septos transversais ou oblíquos; ou ainda podem aparecer no formato navicular com septo transversal (STATZELL-TALLMAN; BELLOCH; FELL, 2008; GUERREIRO *et al.*, 2013).

Este gênero apresenta apenas cinco espécies descritas até o momento e na Coleção encontramos apenas a *Kwoniella heveanensis* (*Cryptococcus heveanensis*) (Figura 35). As células são ovais ou esféricas. Podem aparecer isoladas ou em pares. Apresentam brotamento polar.

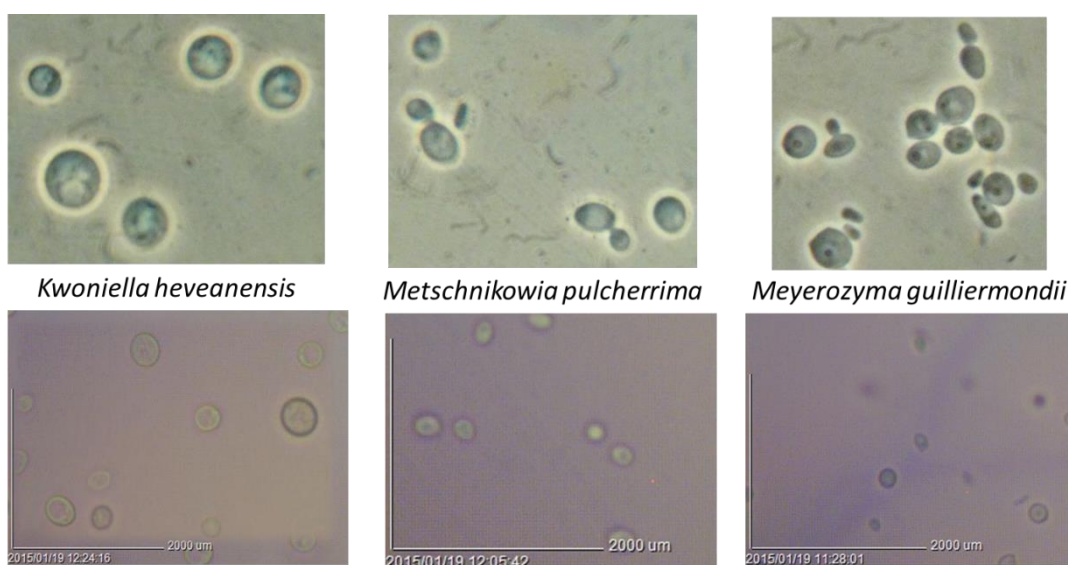


FIGURA 35 – MICROSCOPIA DA ESPÉCIE *Kwoniella heveanensis*, *Metschnikowia pulcherrima* E *Meyerozyma guilliermondii*

As imagens superiores foram obtidas usando contraste de fase e com um aumento de 2.000x. As imagens inferiores foram obtidas usando campo claro e com um aumento de 400x

5.4.5 Gênero *Metschnikowia*

Pertencem ao grupo dos ascomicetos. As células são esferoides, elipsoides, cilíndricas ou piriformes. Reproduzem-se por brotamento multilateral. Apresentam pseudomicélio rudimentar. Os ascos são alongados com um a dois ascósporos que possuem formato de agulha (KREGER-VAN RIJ, 1984).

Neste gênero foi encontrada na Coleção a espécie *Metschnikowia pulcherrima* (*Candida pulcherrima*), a qual apresenta células globosas ou elipsoides. São encontradas isoladas, em pares, ou formando pequenas cadeias ou grupos (Figura 35).

5.4.6 Gênero *Meyerozyma*

Pertencem ao grupo dos ascomicetos. As células são ovais ou alongadas. Reproduzem-se por brotamento multilateral. Apresentam pseudomicélio abundante, mas micélio verdadeiro está ausente. Os ascos apresentam de um a quatro ascósporos, os quais apresentam formato oval ou de chapéu (KURTZMAN, C.; SUZUKI, 2010).

A espécie *Meyerozyma guilliermondii* (*Candida guilliermondii*) foi encontrada na Coleção. As células apresentam-se no formato ovóide ou alongadas. São encontradas isoladas ou em pares (Figura 35).

5.4.7 Gênero *Pichia*

Pertencem ao grupo dos ascomicetos. As células são esferoides, elipsoides ou alongadas. Apresentam pseudomicélio e, por vezes, podem apresentar micélio verdadeiro. O asco possui de um a quatro (raramente mais de quatro) ascósporos que se apresentam no formato de chapéu, meia-esfera ou esferoidais. Algumas espécies podem também formar artrósporos (KREGER-VAN RIJ, 1984).

Neste gênero foram encontradas na Coleção as seguintes espécies *Pichia galeiformis*, *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), *Pichia kluyveri*, *Pichia myanmarensis* e *Pichia occidentalis* (*Candida sorbosa*). As três espécies apresentam células no formato ovóide ou alongadas, enquanto as células da *Pichia myanmarensis* apresentam-se esféricas ou ovais. Todas elas se apresentam isoladas, em pares ou pequenas cadeias (Figura 36).

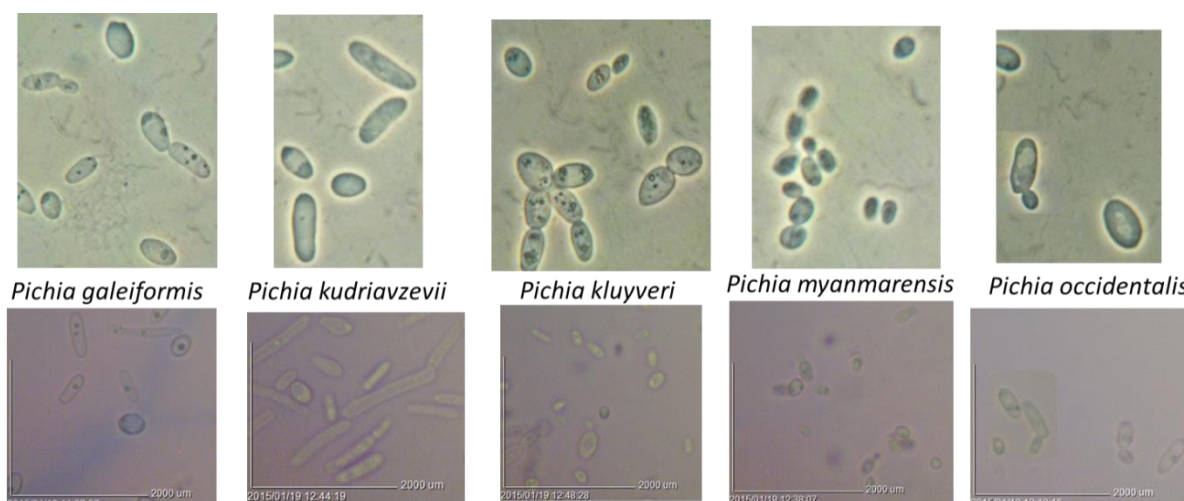


FIGURA 36 – MICROSCOPIA DAS CÉLULAS DE *Pichia galeiformis*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia kluyveri*, *Pichia myanmarensis* E *Pichia occidentalis*

As imagens superiores foram obtidas usando contraste de fase e com um aumento de 2.000x. As imagens inferiores foram obtidas usando campo claro e com um aumento de 400x

5.4.8 Gênero *Sporidiobolus*

Pertence ao grupo dos basidiomicetos. As células deste gênero são esféricas, ovais, cilíndricas ou alongadas. A reprodução vegetativa é por brotamento, formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro e por formação de balistosporos. A reprodução sexuada se dá por meio da formação dos basidiósporos (KREGER-VAN RIJ, 1984).

Na Coleção foram encontradas as espécies *Sporidiobolus ruineniae* e *Sporidiobolus pararoseus* cujas células se apresentam ovais ou alongadas e exibem brotamento multipolar (Figura 37).

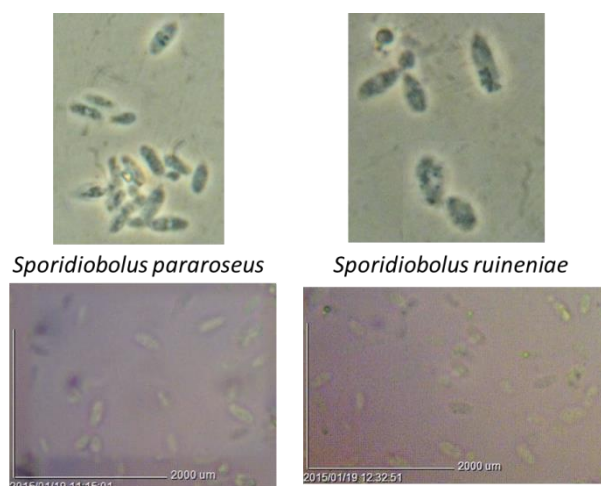


FIGURA 37 - MICROSCOPIA DAS CÉLULAS DE *Sporidiobolus ruineniae* E *Sporidiobolus pararoseus*

As imagens superiores foram obtidas usando contraste de fase e com um aumento de 2.000x. As imagens inferiores foram obtidas usando campo claro e com um aumento de 400x

5.4.8 Gênero *Saccharomyces*

Pertence ao grupo dos ascomicetos. As células são globosas, elipsoides ou cilíndricas. Reproduzem-se por brotamento multilateral. Apresentam formação de pseudomicélio. O asco possui de um a quatro (ocasionalmente até mais) ascósporos, os quais são globosos a elipsoides (KREGER-VAN RIJ, 1984).

Neste gênero foi encontrada na Coleção a espécie *Saccharomyces cerevisiae* (*Candida robusta*). As células se apresentam globosas ou elipsoides, podendo ser encontradas isoladas, em pares, ou formando pequenas cadeias ou grupos (Figura 38).

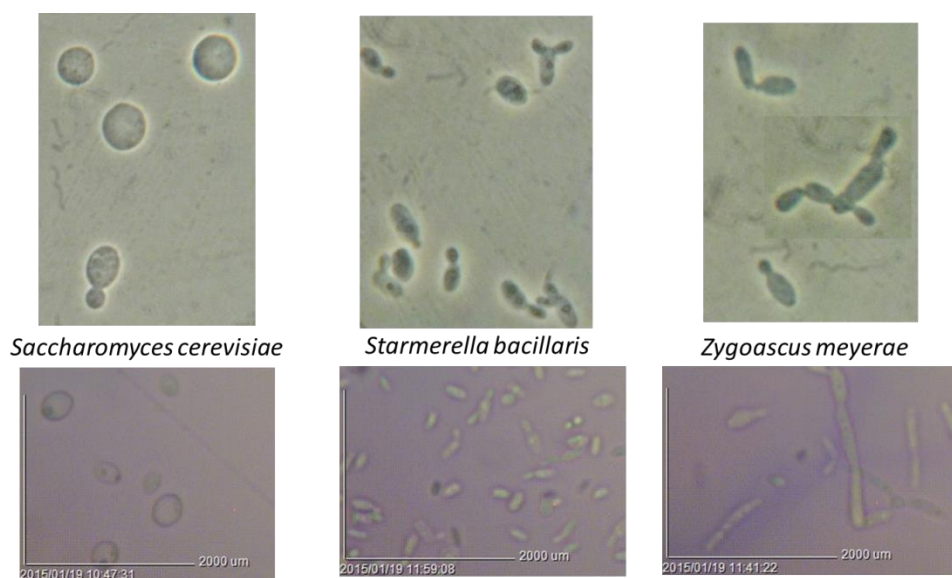


FIGURA 38 – MICROSCOPIA DAS CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae*, *Starmerella bacillaris* E *Zygoascus meyeriae*.

As imagens superiores foram obtidas usando contraste de fase e com um aumento de 2.000x. As imagens inferiores foram obtidas usando campo claro e com um aumento de 400x

5.4.9 Gênero *Starmerella*

Pertencem ao grupo dos ascomicetos. As células apresentam formato ovoide ou elipsoide. A reprodução se dá por brotamento multilateral. O asco possui apenas um ascósporo esferoidal no interior, o qual apresenta uma saliência na membrana basal. Não exibem formação de pseudomicélio e nem micélio verdadeiro (ROSA; LACHANCE, 1998).

A espécie *Starmerella bacillaris* (*Candida zemplinina*) foi encontrada na Coleção. Na microscopia, as células se apresentaram no formato elipsoide ou alongado (Figura 38).

5.4.10 Gênero *Zygoascus*

Pertencem ao grupo dos ascomicetos. As células são ovais e se reproduzem por brotamento multilateral. Apresentam pseudomicélio bem ramificado e também micélio verdadeiro. O asco possui de um a quatro ascósporos no formato de meia-esfera ou de chapéu (SMITH, 1986).

A espécie *Zygoascus meyeræ* foi encontrada na Coleção. As células se apresentaram ovais ou alongadas (Figura 38).

6 CONCLUSÃO

A espectrometria de massa MALDI-TOF apresentou-se como uma técnica precisa, rápida, de baixo custo analítico e abrangente para a identificação de leveduras ambientais e de interesse agroindustrial. Além disso, esta técnica pode ser uma alternativa para problemas de identificação com técnicas de biologia molecular como nos casos de não amplificação ou da presença de espécies com o mesmo perfil de restrição.

O Banco de Dados Biotyper não foi suficiente para identificar todas as linhagens presentes na Coleção. A construção de um Banco de Dados Suplementar, a partir dos valiosos resultados de identificação fornecidos pelas técnicas de biologia molecular, foi imprescindível para a completa identificação das mesmas. A rapidez na obtenção dos resultados de identificação por MALDI-TOF MS coloca esta técnica como uma importante ferramenta para uso em Coleções de Culturas Microbianas que trabalham com uma grande demanda de identificações e autenticações de linhagens.

Em suma, os espectros de massa obtidos por MALDI-TOF, aliados a um programa que permite ao usuário alimentar o banco de dados existente, eleva a espectrometria de massa ao nível de uma promissora técnica de identificação de microrganismos dos mais diversos ambientes.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. V. D.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**. v. 2, n.2, p. 236-251. 2004.
- ALATOOM, A. A. *et al.* Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n.8, p. 2868-73. 2011.
- ALBALAT, A. *et al.* Improving peptide relative quantification in MALDI-TOF MS for biomarker assessment. **PROTEOMICS**. v. 13, n.20, p. 2967-2975. 2013.
- ALBRETHSEN, J. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. **Clinical Chemistry**. v. 53, n.5, p. 852-8. 2007.
- ÁLVAREZ-MARTÍN, P. *et al.* Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. **International Dairy Journal**. v. 17, p. 961-967. 2007.
- AMANN, R.; FUCHS, B. M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 12, n.3, p. 231-236. 2001.
- AMIRI-ELIASI, B.; FENSELAU, C. Characterization of Protein Biomarkers Desorbed by MALDI from Whole Fungal Cells. **Analytical Chemistry**. v. 73, n.21, p. 5228-5231. 2001.
- ANDORRÀ, I. *et al.* Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. **LWT - Food Science and Technology**. v. 49, n.1, p. 8-13. 2012.
- ANDORRÀ, I. *et al.* Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. **Food Microbiology**. v. 25, n.7, p. 849-856. 2008.
- ARNOLD, R. J.; REILLY, J. P. Observation of Escherichia coli Ribosomal Proteins and Their Posttranslational Modifications by Mass Spectrometry. **Analytical Biochemistry**. v. 269, n.1, p. 105-112. 1999.
- ARROYO-LÓPEZ, F. N. *et al.* Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. **Food Microbiology**. v. 23, n.8, p. 791-796. 2006.
- BALEIRAS COUTO, M. M.; REIZINHO, R. G.; DUARTE, F. L. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations. **International Journal of Food Microbiology**. v. 102, n.1, p. 49-56. 2005.

BALEIRAS COUTO, M. M. *et al.* RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. **International Journal of Food Microbiology**. v. 24, n.1–2, p. 249-260. 1994.

BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**. v. 153, n.3, p. 243-259. 2012.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 2.ed. New York: Cambridge University, 1990.

BAUTISTA-GALLEGO, J. *et al.* Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. **International Journal of Food Microbiology**. v. 147, n.2, p. 89-96. 2011.

BEL, A. D. *et al.* Acceptance criteria for identification results of gram-negative rods by mass spectrometry. **Journal of Medical Microbiology**. v. 60, n.5, p. 684-686. 2011.

BERNARDI, T. L.; SILVA, G. A. D.; VALENTE, P. Considerações sobre a presença dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* em vinhos. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**. v. 3, p. 44-50. 2011.

BERNARDO, K. *et al.* Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**. v. 2, n.6, p. 747-53. 2002.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, p. 1614-1619. 2010.

BOKULICH, N. A. *et al.* Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. p. 2013.

BOUNDY-MILLS, K. Yeast culture collections of the world: meeting the needs of industrial researchers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 39, n.5, p. 673-680. 2012.

BOVO, B. *et al.* Yeast population dynamics during pilot-scale storage of grape marcs for the production of Grappa, a traditional Italian alcoholic beverage. **International Journal of Food Microbiology**. v. 129, n.3, p. 221-228. 2009.

BRASIL. A convenção sobre diversidade biológica. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília, 2000.

BUCKNALL, M.; FUNG, K. Y. C.; DUNCAN, M. W. Practical quantitative biomedical applications of MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. v. 13, n.9, p. 1015-1027. 2002.

BUNGERT, D.; HEINZLE, E.; THOLEY, A. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the determination of enzyme activities. **Analytical Biochemistry**. v. 326, n.2, p. 167-175. 2004.

CADEZ, N. *et al.* *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 53, n.Pt 5, p. 1671-80. 2003.

CAIN, T. C. *et al.* Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 8, n.12, p. 1026-1030. 1994.

CALDERARO, A. *et al.* Identification of *Borrelia* species after creation of an in-house MALDI-TOF MS database. **PLoS One**. v. 9, n.2, p. e88895. 2014a.

CALDERARO, A. *et al.* Identification of Dermatophyte Species after Implementation of the In-House MALDI-TOF MS Database. **Int J Mol Sci**. v. 15, n.9, p. 16012-24. 2014b.

CARBONNELLE, E. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**. v. 44, p. 104-109. 2011.

CENDEJAS-BUENO, E. *et al.* Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n.5, p. 1895-1899. 2010.

CHALUPOVA, J. *et al.* MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 47, n.8, p. 978-86. 2012.

CHEN, P.; LU, Y.; HARRINGTON, P. B. Biomarker Profiling and Reproducibility Study of MALDI-MS Measurements of *Escherichia coli* by Analysis of Variance-Principal Component Analysis. **Analytical Chemistry**. v. 80, n.5, p. 1474-1481. 2008.

CHRISTENSEN, J. J. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of Gram-positive, catalase-negative cocci not belonging to the *Streptococcus* or *Enterococcus* genus and benefits of database extension. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n.5, p. 1787-91. 2012.

CIANI, M.; COMITINI, F. Non-Saccharomyces wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Annals of Microbiology**. v. 61, n.1, p. 25-32. 2011.

CLAYDON, M. A. *et al.* The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**. v. 14, n.11, p. 1584-1586. 1996.

COUTO, M. M. B. *et al.* Evaluation of Molecular Typing Techniques to Assign Genetic Diversity among *Saccharomyces cerevisiae* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n.1, p. 41-46. 1996.

D'IMPERIO, M. *et al.* Standardized sample preparation phases for a quantitative measurement of plasma peptidome profiling by MALDI-TOF. **J Proteomics**. v. 73, n.7, p. 1355-67. 2010.

DA SILVA, G. A. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italico grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 46, n.2, p. 112-121. 1996.

DA SILVA, G. A. **Composição para o Controle Biológico de Fitopatógenos, processo de sua obtenção e seus usos**. INPI. EMBRAPA. Brasil. 2002. BR0201063

DE BRUYNE, K. *et al.* Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 34, n.1, p. 20-29. 2011.

DEÁK, T. Simplified techniques for identifying foodborne yeasts. **International Journal of Food Microbiology**. v. 19, n.1, p. 15-26. 1993.

DEBODE, J. *et al.* Effect of fungicides on epiphytic yeasts associated with strawberry. **Microbiology Open**. v. 2, n.3, p. 482-491. 2013.

DEMIREV, P. A.; FENSELAU, C. Mass spectrometry in biodefense. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 43, n.11, p. 1441-1457. 2008.

DEMIREV, P. A. *et al.* Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. **Analytical Chemistry**. v. 71, n.14, p. 2732-2738. 1999.

DESNOS-OLLIVIER, M. *et al.* Molecular identification of black-grain mycetoma agents. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n.10, p. 3517-23. 2006.

DHIMAN, N. *et al.* Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n.4, p. 1614-1616. 2011.

DI MARO, E.; ERCOLINI, D.; COPPOLA, S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. **International Journal of Food Microbiology**. v. 117, n.2, p. 201-210. 2007.

DIAS, L. *et al.* Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. **Food Microbiol**. v. 20, p. 567-574. 2003.

DOMIN, M. A.; WELHAM, K. J.; ASHTON, D. S. The effect of solvent and matrix combinations on the analysis of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 13, n.4, p. 222-226. 1999.

DREVINEK, M. *et al.* Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. **Letters in Applied Microbiology**. v. 55, n.1, p. 40-6. 2012.

DUARTE, F. L. *et al.* *Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 102, n.4, p. 653-658. 2012.

BRASIL. Rede Microbiana: rede de recursos genéticos microbianos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, 2010.

ERHARD, M.; VON DOHREN, H.; JUNGBLUT, P. Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. **Nature Biotechnology**. v. 15, n.9, p. 906-9. 1997.

ESTEVE-ZARZOSO, B. *et al.* Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 49, p. 329-337. 1999.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P. A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 20, n.4, p. 157-171. 2001.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T. *et al.* RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. **Anton van Leeuw**. v. 78, n.1, p. 87-97. 2000.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T. *et al.* Molecular Identification and Characterization of Wine Yeasts. In: CARRASCOSA, A. V.; MUÑOZ, R.; GONZÁLEZ, R. **Molecular Wine Microbiology**. London: Elsevier, 2011. p.112-141.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**. v. 86, n.1–2, p. 11-22. 2003.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**. v. 8, n.7, p. 979-995. 2008.

FRUTOS, R. D.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; QUEROL, A. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **Anton van Leeuw**. v. 85, n.3, p. 175-185. 2004.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia, Diagnóstico e Análise de Variabilidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 17, p. 12-16. 2000.

GAIA, V.; CASATI, S.; TONOLLA, M. Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 34, n.1, p. 40-44. 2011.

GAYEVSKIY, V.; GODDARD, M. R. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. **ISME J.** v. 6, n.7, p. 1281-1290. 2012.

GILBERT, J. A.; VAN DER LELIE, D.; ZARRAONAINDIA, I. Microbial terroir for wine grapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 111, n.1, p. 5-6. 2014.

GOYER, M. *et al.* Optimization of the preanalytical steps of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification provides a flexible and efficient tool for identification of clinical yeast isolates in medical laboratories. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 50, n.9, p. 3066-8. 2012.

GRANCHI, L. *et al.* Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR–RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology.** v. 87, n.6, p. 949-956. 1999.

GUERREIRO, M. A. *et al.* Molecular and Genetic Evidence for a Tetrapolar Mating System in the Basidiomycetous Yeast *Kwoniella mangrovensis* and Two Novel Sibling Species. **Eukaryotic Cell.** v. 12, n.5, p. 2013.

GUILLAMÓN, J. M. *et al.* Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology.** v. 169, n.5, p. 387-392. 1998.

HATHOUT, Y. *et al.* Kurstakins: A New Class of Lipopeptides Isolated from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Natural Products.** v. 63, n.11, p. 1492-1496. 2000.

HAWKSWORTH, D. L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? **Biodiversity and Conservation.** v. 21, n.9, p. 2425-2433. 2012.

HAWKSWORTH, D. L. *et al.* The amsterdam declaration on fungal nomenclature. **IMA Fungus.** v. 2, n.1, p. 105-12. 2011.

HENDRICKX, M. *et al.* Screening of strains of the *Candida parapsilosis* group of the BCCM/IHEM collection by MALDI-TOF MS. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v. 70, n.4, p. 544-548. 2011.

HETTICK, J. M. *et al.* Proteomic Profiling of Intact Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry.** v. 76, n.19, p. 5769-5776. 2004.

HIERRO, N. *et al.* Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. **FEMS Yeast Res.** v. 6, n.1, p. 102-111. 2006.

HIERRO, N. *et al.* New PCR-based methods for yeast identification. **Journal of Applied Microbiology.** v. 97, n.4, p. 792-801. 2004.

HOLLAND, R. D. *et al.* Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 10, n.10, p. 1227-1232. 1996.

HUGHES, K. W.; PETERSEN, R. H.; LICKY, E. B. Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. **New Phytologist**. v. 182, n.4, p. 795-798. 2009.

JAMAL, W. Y. *et al.* Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 26, n.0, p. 167-170. 2014.

JAMES, S. A. *et al.* Repetitive sequence variation and dynamics in the ribosomal DNA array of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by whole-genome resequencing. **Genome Research**. v. 19, n.4, p. 626-635. 2009.

KEYS, C. J. *et al.* Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 4, n.3, p. 221-242. 2004.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3.ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1984.

KURTZMAN, C.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleriomyces*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**. v. 51, n.1, p. 2-14. 2010.

KURTZMAN, C. P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 64, p. 325-332. 2014.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 73, n.4, p. 331-71. 1998.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex' determined from multigene sequence analyses. **FEMS Yeast Res.** v. 3, n.4, p. 417-432. 2003.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen.nov., *Lindnera* gen.nov. and *Wickerhamomyces* gen.nov. **FEMS Yeast Res.** v. 8, p. 939-954. 2008.

LARTIGUE, M. F. *et al.* Identification of *Streptococcus agalactiae* Isolates from Various Phylogenetic Lineages by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time

of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n.7, p. 2284-2287. 2009.

LAU, A. F. *et al.* Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n.3, p. 828-34. 2013.

LAY, J. O. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria*. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 20, n.4, p. 172-194. 2001.

LAY JR, J. O. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v. 19, n.8, p. 507-516. 2000.

LIU, H. *et al.* Universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n.6, p. 1899-907. 2007.

LOPES, M. D. B. *et al.* PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n.12, p. 4514-4520. 1996.

LV, X.-C. *et al.* Yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing, revealed by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Control**. v. 34, n.1, p. 183-190. 2013.

MADIGAN, M. T. *et al.* Eukaryotic Cell Biology and Eukaryotic Microorganisms. In: MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. **Brock: Biology of Microorganisms**. Califórnia: Pearson Education, 2012. p.584-612.

Bruker Daltonics. **Microorganism Identification and Classification Based on MALDI-TOF MS Fingerprinting with MALDI Biotyper**. Germany: 2008.

MARKLEIN, G. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n.9, p. 2912-2917. 2009.

MELLMANN, A. *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n.6, p. 1946-54. 2008.

MITCHELL, J. I.; ZUCCARO, A. Sequences, the environment and fungi. **Mycologist**. v. 20, p. 62-74. 2006.

MOOTHOO-PADAYACHIE, A. *et al.* Biotyping *Saccharomyces cerevisiae* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Eur Food Res Technol**. v. 236, n.2, p. 351-364. 2013.

MOTER, A.; GÖBEL, U. B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**. v. 41, n.2, p. 85-112. 2000.

MUCCILLI, S. *et al.* Yeast dynamics during the fermentation of brined green olives treated in the field with kaolin and Bordeaux mixture to control the olive fruit fly. **International Journal of Food Microbiology**. v. 148, p. 15-22. 2011.

MURRAY, P. R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, n.11, p. 1626-1630. 2010.

NAGATSUKA, Y.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. *Pichia myanmarensis* sp. nov., a novel cation-tolerant yeast isolated from palm sugar in Myanmar. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 55, n.Pt 3, p. 1379-82. 2005.

NORVELL, L. L. Fungal nomenclature.
1. Melbourne approves a new Code. **Mycotaxon**. v. 116, n.1, p. 481-490. 2011.

PAN, Y.-L. *et al.* Identification of lethal *Aspergillus* at early growth stages based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 70, n.3, p. 344-354. 2011.

PÉTER, G. *et al.* *Pichia sporocuriosa* sp. nov., a new yeast isolated from rambutan. **Anton van Leeuw**. v. 77, n.1, p. 37-42. 2000.

PFALLER, M. A. *et al.* Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 26, n.8, p. 1437-41. 1988.

PHAM, T. *et al.* Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'wild' yeast contaminants. **J I Brewing**. v. 117, n.4, p. 556-568. 2011.

PINTO, A. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. **PLoS ONE**. v. 6, n.10, p. e25712. 2011.

QIAN, J. *et al.* MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. **Anal Bioanal Chem**. v. 392, n.3, p. 439-449. 2008.

RASPOR, P. *et al.* Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. **International Journal of Food Microbiology**. v. 109, n.1-2, p. 97-102. 2006.

RASPOR, P.; ZUPAN, J.; CADEZ, N. Validation of yeast identification by *in silico* RFLP. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**. v. 15, n.3, p. 267-281. 2007.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n.5, p. 771-780. 2004.

RIBEIRO, J. R. A. *et al.* *Candida middelhoveniana* sp. nov., a new yeast species found on the rhizoplane of organically cultivated sugarcane. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 100, p. 341-347. 2011.

RIBÉREAU-GAYON, P. *et al.* **Handbook of enology: The microbiology of wine and vinifications**. 2.ed. Inglaterra: John Wiley & Sons, 2006.

RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J. *et al.* Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatization. **Journal of Chromatography A**. v. 1216, n.30, p. 5640-5646. 2009.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F. *et al.* Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. **Food Microbiol.** v. 27, n.5, p. 604-612. 2010.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M. A. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 48 Pt 4, p. 1413-7. 1998.

RYZHOV, V.; FENSELAU, C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. **Analytical Chemistry**. v. 73, n.4, p. 746-50. 2001.

SABATE, J. *et al.* Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. **Microbiological Research**. v. 157, p. 267-274. 2002.

SAENZ, A. J. *et al.* Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 13, n.15, p. 1580-5. 1999.

SAEZ, J. S. *et al.* Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. **Food Microbiology**. v. 28, n.3, p. 503-509. 2011.

SALTANATPOUR, Z. *et al.* Use of Random Amplified Polymorphic DNA to Identify *Candida* species, originated from Cancer Patients. **International Journal of Hematology Oncology and Stem Cell Research**. v. 5, n.23-28, p. 2011.

SANDRIN, T. R.; GOLDSTEIN, J. E.; SCHUMAKER, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 32, n.3, p. 188-217. 2013.

SANTOS, C. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 71, n.3, p. 304-308. 2011.

SAUER, S. *et al.* Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. **PLoS One**. v. 3, n.7, p. e2843. 2008.

SCHOCH, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 109, n.16, p. 6241-6246. 2012.

SCHUMAKER, S.; BORROR, C. M.; SANDRIN, T. R. Automating data acquisition affects mass spectrum quality and reproducibility during bacterial profiling using an intact cell sample preparation method with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 26, n.3, p. 243-253. 2012.

SCORZETTI, G. *et al.* Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**. v. 2, n.4, p. 495-517. 2002.

SEDO, O.; SEDLACEK, I.; ZDRAHAL, Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 30, n.3, p. 417-34. 2011.

SENG, P. *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**. v. 49, n.4, p. 543-51. 2009.

SETTANNI, L. *et al.* Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. **J Bios Bioeng**. v. 114, n.6, p. 606-614. 2012.

SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. **Fungal Genetics and Biology**. v. 60, n.0, p. 2-8. 2013.

SILVA, G. A. Dekkera e Bretanomyces: Leveduras não Competitivas que Deterioram Vinhos. **Documentos Embrapa** v. 41, n.1516-8107, p. 2005.

SILVA, G. A. *et al.* Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. **Braz Arch Biol Techn**. v. 55, n.2, p. 319-327. 2012.

SMITH, M. T. *Zygoascus hellenicus* gen. nov., sp. nov., the teleomorph of *Candida hellenica* (= *C. inositophila* = *C. steatolytica*). **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 52, n.1, p. 25-37. 1986.

STATZELL-TALLMAN, A.; BELLOCH, C.; FELL, J. W. *Kwoniella mangroviensis* gen. nov., sp. nov. (Tremellales, Basidiomycota), a teleomorphic yeast from mangrove habitats in the Florida Everglades and Bahamas. **FEMS Yeast Research**. v. 8, n.1, p. 103-113. 2008.

STEVENSON, L. G. *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n.10, p. 3482-6. 2010.

STRINGINI, M. *et al.* Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**. v. 127, p. 184-189. 2008.

STROHALM, M. *et al.* mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 22, n.6, p. 905-908. 2008.

SUN, S. *et al.* Validation of *Kwoniella heveanensis*, teleomorph of the basidiomycetous yeast *Cryptococcus heveanensis*. **Mycotaxon**. v. 116, n.1, p. 227-229. 2011.

THANH, V. N.; HAI, D. A.; LACHANCE, M. A. *Issatchenkia hanoiensis*, a new yeast species isolated from frass of the litchi fruit borer *Conopomorpha cramerella* Snellen. **FEMS Yeast Res.** v. 4, n.1, p. 113-117. 2003.

UEDA-NISHIMURA, K.; MIKATA, K. Reclassification of *Pichia scaptomyzae* and *Pichia galeiformis*. **Anton van Leeuw.** v. 79, n.3-4, p. 371-375. 2001.

UHLIK, O. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-time of flight mass spectrometry- and MALDI biotyper-based identification of cultured biphenyl-metabolizing bacteria from contaminated horseradish rhizosphere soil. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77, n.19, p. 6858-66. 2011.

VAIDYANATHAN, S. *et al.* Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass (>20 kDa) proteins. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 16, n.13, p. 1276-86. 2002.

VALENTINE, N. *et al.* Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n.1, p. 58-64. 2005.

VAN VEEN, S. Q.; CLAAS, E. C.; KUIJPER, E. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n.3, p. 900-7. 2010.

VARGHA, M. *et al.* Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. **Journal of Microbiological Methods**. v. 66, n.3, p. 399-409. 2006.

VELÁZQUEZ, E. *et al.* YeastIdent-Food/ProleFood, a new system for the identification of food yeasts based on physiological and biochemical tests. **Food Microbiol.** v. 18, n.6, p. 637-646. 2001.

VELOO, A. C. *et al.* Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 34, n.1, p. 58-62. 2011.

VENEMA, J.; TOLLERVEY, D. RIBOSOME SYNTHESIS IN *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Genetics**. v. 33, n.1, p. 261-311. 1999.

VIGENTINI, I.; PICOZZI, C.; FOSCHINO, R. Intron splice site PCR analysis as a tool to discriminate *Dekkera bruxellensis* strains. **Annals of Microbiology**. v. 61, n.1, p. 153-157. 2011.

VILLA-CARVAJAL, M.; QUEROL, A.; BELLOCH, C. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene. **Anton van Leeuw**. v. 90, n.2, p. 171-181. 2006.

VORM, O.; ROEPSTORFF, P.; MANN, M. Improved Resolution and Very High-Sensitivity in Maldi ToF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. **Analytical Chemistry**. v. 66, n.19, p. 3281-3287. 1994.

WALKER, J. *et al.* Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. **Journal of Microbiological Methods**. v. 48, n.2-3, p. 117-126. 2002.

WANG, C.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; MAS, A. Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization. **International Journal of Food Microbiology**. v. 191, n.0, p. 1-9. 2014.

WANG, C.; LIU, Y. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. **Food Microbiol.** v. 33, n.2, p. 172-7. 2013.

WANG, Z. *et al.* Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 12, n.8, p. 456-464. 1998.

WEUSTHUIS, R. A. *et al.* Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. **Microbiology**. v. 140 (Pt 4), p. 703-15. 1994.

World Federation for Culture Collections. **Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Culture of Microorganisms**. Bélgica: WFCC, 2010.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego, CA: Academic Press, 1990. p.315–322.

WIESER, A. *et al.* MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 93, p. 965–974. 2012.

WILLIAMS, T. L. *et al.* Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. v. 14, n.4, p. 342-351. 2003.

XUFRE, A. *et al.* Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. **International Journal of Food Microbiology**. v. 108, n.3, p. 376-384. 2006.

XUFRE, A. *et al.* Use of RAPD analysis for differentiation among six enological *Saccharomyces* spp. strains. **Food Technology and Biotechnology**. v. 38, n.1, p. 53-58. 2000.